

ACADEMIE DE MONTPELLIER  
UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

**Dossier**  
**pour obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches**  
**Ecole Doctorale SIBAGHE Montpellier II**

**Pascal MONTORO**

## HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

NOM et Prénom : Montoro Pascal

Section CNU :

Titre des Travaux : Bases moléculaires de la tolérance aux stress d'exploitation  
chez *Hevea brasiliensis*

**Date, heure et lieu de soutenance : 12 juin 2009, 14h00, Amphi Alliot,  
CIRAD**

### Résumé des ouvrages ou des travaux :

L'exploitation de l'hévéa pour le caoutchouc naturel nécessite la mise en œuvre de la saignée et pour certains clones l'application d'éthéphon, un générateur d'éthylène, pour stimuler l'écoulement et la régénération du latex entre deux saignées. Les mécanismes de défense au sein du tissu laticifère sont à la base de la production de latex et du déclenchement de dysfonctionnements cellulaires conduisant à l'arrêt de production. L'étude des voies de régulation des gènes de réponse à la blessure et à l'éthylène a été entreprise afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires coordonnant les voies métaboliques de la régénération du latex et de la biosynthèse de la molécule de cis-polyisoprène, mais aussi de la coagulation des particules de caoutchouc et de la formation d'une lame brune au niveau de l'écorce. Ces travaux s'appuient sur les outils biotechnologiques, l'embryogenèse somatique et la transformation génétique, et sur les ressources moléculaires développées progressivement. Dans ce cadre, l'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène et du jasmonate, et des systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène ont été entreprises chez trois clones d'hévéa à métabolisme contrasté.

**Composition du Jury proposé (\*) :** (Indiquer leur adresse au verso)

Nom et Prénom	Grade	Etablissement
Jean-Claude PECH	Professeur	INP-ENSAT, Toulouse
Lise JOUANIN	DR1	CNRS, INRA-Versailles
Soulaiman SAKR	Professeur	Agrocampus-ouest, Centre d'Angers, INHP
Pascal GANTET	Professeur	UM2, UMR DAP, Montpellier
Emmanuel GUIDERDONI	HDR	CIRAD, UMR DAP, Montpellier
Marc-Philippe CARRON	HDR	CIRAD, UMR DAP, Montpellier

# SOMMAIRE

<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>3</b>
<b>RESUME DES ACTIVITES D'ENCADREMENT</b>	<b>9</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE</b>	<b>15</b>
<b>RESUMES DES TRAVAUX</b>	<b>25</b>
1. Introduction	26
1.1 Mécanismes de défense au sein des tissus de l'écorce chez <i>Hevea brasiliensis</i>	26
1.2 Axes de recherche	26
1.3 Organisation des compétences et des opérations de recherche	27
1.4 Articulation du résumé des travaux	27
2. Embryogenèse somatique	29
2.1 Amélioration de l'embryogenèse somatique primaire chez l'hévéa	29
2.2 Obtention de cal friable embryogène et établissement de cultures entretenues en milieu semi-solide ou liquide chez l'hévéa	30
2.3 Nouvelle stratégie visant la cryoconservation précoce des lignées de cal friable embryogène chez l'hévéa	30
2.4 Expériences chez d'autres espèces végétales	32
2.5 Conclusions	32
3. Transformation génétique	34
3.1 Transformation génétique du cotonnier pour la résistance aux insectes ravageurs	34
3.2 Transformation génétique de l'hévéa pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production de latex et la tolérance aux stress d'exploitation	34
4. Lutte contre le stress oxydatif dans les laticifères	35
4.1 Systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène chez l'hévéa	35
4.2 Production de lignées transgéniques modifiées pour les systèmes de détoxification des ROS	36
4.3 Etude des différents niveaux de régulation du stress oxydatif	37
5. Caractérisation des gènes de biosynthèse et de réponses à l'éthylène chez <i>Hevea brasiliensis</i>	37
5.1 Rôle de l'éthylène chez l'hévéa	37
5.2 Biosynthèse de l'éthylène	37
5.3 Localisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène par hybridation <i>in situ</i>	38
5.4 Gènes régulés par l'éthylène	39
5.5 Dissection des phénomènes dépendants ou non de l'éthylène	39
6. Interaction entre l'éthylène et le jasmonate	40
6.1 Organisation de la famille des ERF chez <i>Hevea brasiliensis</i>	40
6.2 Expression hétérologue du gène <i>AtERF1</i> dans des plants transgéniques d'hévéa	42
6.3 Identification des gènes candidats impliqués dans l'interaction entre l'éthylène, la blessure et le jasmonate par approche transcriptomique	43
7. Conclusions	44
8. Références citées autres que celles du laboratoire	47

## CURRICULUM VITAE

## Pascal MONTORO

Nationalité	française
Date de naissance	né le 29 octobre 1963
Situation familiale	Marié, 2 enfants
Adresse professionnelle	CIRAD, Département des Systèmes biologiques UMR Développement et amélioration des plantes TA A-96/03, Avenue Agropolis - 34398 Montpellier Cédex 5  Tél: 04 67 61 56 82 Fax: 04 67 61 55 96 Courriel: <a href="mailto:pascal.montoro@cirad.fr">pascal.montoro@cirad.fr</a> Sites web: <a href="http://umr-dap.cirad.fr/equipes/burst">http://umr-dap.cirad.fr/equipes/burst</a>
Profession	Chercheur CIRAD en CDI depuis juillet 1995 affecté à l'UMR-DAP

## FORMATION

<b>2007</b>	<b>Accréditation à diriger des recherches.</b> Formation doctorale SIBAGHE Université Montpellier II.
<b>1998</b>	<b>Advisor-Professor.</b> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University (KU Graduate School, registered code XA 462, 4 Dec 1998)
<b>1993</b>	<b>Doctorat de Physiologie Végétale.</b> Université Montpellier II. Directeur de thèse : Pr. J. d'Auzac, encadrement M.P. Carron (CIRAD). Etablissement de cultures embryogènes en suspension chez <i>Hevea brasiliensis</i> . Incidence des facteurs du milieu sur l'histogenèse des cals, leur friabilité et l'expression de l'embryogenèse.
<b>1989</b>	<b>Diplôme d'Etude Approfondie en Sciences Agronomiques.</b> Univ. Montpellier II
<b>1987</b>	<b>Maîtrise de Biochimie.</b> Université Montpellier II
<b>1983</b>	<b>Baccalauréat série C.</b> Lycée Charles Gides, Uzès

## EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

<b>2007- à ce jour</b>	<b>Responsable de l'équipe <i>BURST</i> (Biologie cellulaire et moléculaire de la Réponse aux STress).</b> CIRAD - Dépt BIOS - UMR-DAP - Montpellier. France <b>Responsable opération <i>Régulation hormonale</i>.</b> Caractérisation de la réponse éthylène, blessure et jasmonate par approches transcriptomique et pharmacologique chez l'hévéa
<b>2003-2006</b>	<b>Représentant des chercheurs au Conseil d'unité de l'UMR-BEPC.</b> UMR-BEPC (Biologie du développement des Espèces Pérennes Cultivées). Montpellier. France
<b>Mai 2002-2006</b>	<b>Chef de l'équipe <i>Biologie du développement de l'hévéa et de la production de caoutchouc naturel</i>.</b> CIRAD - Dépt CP - UMR-BEPC - Montpellier. France <b>Responsable opération <i>Ethylène</i>.</b> Isolement et caractérisation de 3 membres de la famille multigénique codant l'ACO. Constitution d'une banque de gènes régulés par l'éthylène
<b>2002 / à ce jour</b>	<b>Coordinateur du réseau biotechnologie hévéa. <i>Liaison Officer for the Biotechnology Group. International Rubber Research and Development Board.</i></b> Kuala Lumpur. Malaisie
<b>2001/2002</b>	<b>Chercheur sur la transformation génétique de l'hévéa.</b> BIOTROP. CIRAD-CP. Montpellier. France
<b>Juil.98/Juin2001</b>	<b>Animateur du projet génie génétique.</b> CIRAD/KAPI. Université de Kasetsart. Bangkok. Thaïlande. Mise au point d'un procédé de transformation génétique chez l'hévéa
<b>1998–1999</b>	<b>Co-coordonateur du Rubber Project.</b> Centre DORAS. Université de Kasetsart. Bangkok – Thaïlande. Projet tripartite avec le RRIT (Rubber Research Insitute of Thailand) et KU (université de Kasetsart) sur les thèmes de l'écophysiologie, la génétique moléculaire et le génie génétique.
<b>Nov1995/Juin1998</b>	<b>Chercheur en physiologie moléculaire.</b> Accueil Expatriation à l'ORSTOM. Département de Biotechnologie. Faculté des Sciences. Université de Mahidol. Bangkok. Thaïlande. Caractérisation des gènes liés à la production de latex.
<b>1993/1995 (24 mois)</b>	<b>Stage Post-doctoral financé par le CIRAD.</b> Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire / Station de génétique. INRA. Versailles 1. Clonage de promoteurs spécifiques du phloème <i>via</i> l'utilisation des méthodes de piégeage de promoteurs chez <i>Arabidopsis thaliana</i> 2. Analyse génétique d'un transformant de la collection d' <i>Arabidopsis thaliana</i> exprimant une activité Gus dans les grains matures de pollen. Préparation à l'isolation moléculaire du promoteur 3. Etude de l'expression de promoteurs inductibles dans le cadre de la lutte contre les ravageurs de cotonnier par transgénèse

## ENCADREMENT D'ETUDIANTS et D'EQUIPES

Au cours de ma carrière, j'ai dirigé ou co-encadré successivement 16 étudiants (13 Master en France, 3 doctorants en France), 12 techniciens (6 en Thaïlande, 6 en France) et 10 chercheurs (2 en Thaïlande et 8 en France) (cf. détails dans les tableaux du chapitre Résumé des activités d'encadrement).

Doctorants	Sujets
Kuswanhadi (2003-2006)	Isolement et caractérisation des gènes de biosynthèse de l'éthylène chez <i>Hevea brasiliensis</i> . In Biologie intégrative. Université Montpellier 2, Montpellier, p. soutenance décembre 2006
Nicolas Niemenak (2006-2007)	Caractérisation du processus d'embryogenèse somatique du cacaoyer et du facteur de transcription Lec 1 like. Thèse de doctorat d'état de l'université de Yaoundé. Co-encadrement avec Laurence Alemanno et Jean-Luc Verdeil
Cuifang Duan (2008-2010)	Etude de l'interaction entre l'éthylène et le jasmonate chez <i>Hevea brasiliensis</i> . Ecole doctorale SIBAGHE

## PARTICIPATION A DES COMITES DE LECTURE

Journaux scientifiques	Nombre de projets analysés
Journal of Experimental Botany	2
Journal of Rubber Research	membre du comité éditorial depuis 2006, révision d'une demi-dizaine d'articles par an en moyenne
New Phytologist	1
Planta	1
Plant Breeding	1
Plant and Cell Physiology	1
Plant Cell Reports	4
Plant Molecular Biology	2
Plant Physiology and Biochemistry	1
Tree Physiology	1

## ENSEIGNEMENT DISPENSE A L'ETRANGER

11/2006 (4h)	Institut de recherche sur le caoutchouc – Chinese Academy for Tropical Agricultural Sciences – Danzhou – Hainan - China	Induction of the callus friability in plant tissues. Development of long-term somatic embryogenesis procedure in <i>Hevea brasiliensis</i>
11/2006 (4h)	Institute for Tropical Bioscience & Biotechnology – Chinese Academy for Tropical Agricultural Sciences – Danzhou – Hainan - China	Ethylene biosynthesis and perception in plants (1h) Recent developments of biotechnologies and studies on ethylene-responsive genes in <i>Hevea brasiliensis</i> (3h)
09/2006 (3h)	Indonesian Biotechnology Research Institute for estate crops & Agricultural Bogor University	Structural and Functional Genomics in plants (1h) Developments of functional genomics in <i>Hevea brasiliensis</i> (2h)
1998-2001	Univ. de Mahidol (Thaïlande) Univ. de Kasetsart	Conférences trimestrielles sur les biotechnologies
1998 (8h)	Rubber Research Institute of Thailand	Cours sur la transgénèse et la régulation de l'expression des gènes

## STAGES SUIVIS

<b>05/2008</b> 4 jours	Formation analyse transcriptomique (puce ADN). Institut Pasteur. Lille
<b>01/2008</b> 2 jours	Management et communication. Renforcement de la cohésion de l'UMR-DAP. Formation Valorécia. Montpellier
<b>10/2002</b> 5 jours	Annotation structurale et fonctionnelle de séquences génomiques. Infobiogen. Evry. France
<b>05/2002</b> 4 jours	Analyse informatique des séquences biologiques. Infobiogen.Evry.France
<b>2001</b> 3 jours	Marketing de l'innovation, CIRAD-Montpellier. France
<b>1993</b> 1 semaine	Amélioration génétique et biologie moléculaire. INRA. Toulouse. France
<b>05/1991</b> 2 semaines	<i>Techniques and application of biotechnology to forest tree species.</i> IDEA. Caracas. Vénézuëla
<b>1987/88</b>	Analyse histologique des tissus embryogènes d'hévéa. Laboratoire de cytogénétique. CIRAD. Montpellier

## COMPETENCES TECHNIQUES

<b>Culture <i>in vitro</i></b>	Embryogenèse somatique, culture de protoplastes
<b>Physiologie &amp; biochimie</b>	Mesures micropsychométriques, HPLC, spectrophotométrie, torche à Plasma, sondes ioniques, purification et activités enzymatiques.
<b>Imagerie cellulaire</b>	Microscopie électronique et photonique, hybridation <i>in situ</i>
<b>Transformation génétique</b>	Cotonnier, du tabac, de l'arabète et de l'hévéa par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<b>Analyse des plantes transgéniques</b>	Southern, Northern, PCR, tests GUS-histochimie et fluorimétrie
<b>Biologie moléculaire</b>	Sous-clonage (construction), clonage de promoteur et d'ADNc par Inverse-PCR et 5' RACE, criblage de banques génomiques et d'ADNc, analyse d'expression par Northern, RT-PCR semi-quantitative et real-time RT-PCR
<b>Transcriptomique</b>	Banques SSH, analyse expression génique sur filtre haute densité
<b>Informatique</b>	Microsoft Office, Vector Nti, Statgraphics, logiciels et bases de données de séquences sur le Web

## CONNAISSANCES LINGUISTIQUES

Langue maternelle	Français
Langues de travail	Anglais
Notions	Espagnol Thaï



## MISSIONS REALISEES

<b>Octobre 2008</b> (1 semaine)	Kuala Lumpur, Malaisie. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB. Invitation
<b>Octobre 2008</b> (1 semaine)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Octobre 2008</b> (1 semaine)	Palembang & Bogor, Indonésie. Workshop IRRDB sur le matériel pour les plantations d'hévéa. Invité co-organisateur.
<b>Septembre 2008</b> (2 jours)	Londres, UK. Préparation d'un projet de collaboration avec le TARRC (Tun Abdul Razak Research Centre)
<b>Mars 2008</b> (3 semaines)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Novembre 2007</b> (1 semaine)	Siam Reap, Cambodge. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB, réunion du Hevea Genome Consortium. Invitation
<b>Novembre 2007</b> (3 semaines)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Novembre 2007</b> (1 semaine)	Haikou & Danzhou, Chine. Signature accord avec le CATAS et préparation de projets de collaboration
<b>Juin 2007</b> (1 semaine)	Bali, Indonésie. International Rubber Conference & Exhibition. Invitation
<b>Juin 2007</b> (1 semaine)	Kuala Lumpur, Malaisie. Asian Pacific Conference on Biotechnologies. Invitation
<b>Mars 2007</b> (3 semaines)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Novembre 2006</b> (1 semaine)	Ho Chi Min Ville, Vietnam. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB. Invitation
<b>Novembre 2006</b> (1 semaine)	Haikou & Danzhou, Chine. Enseignement. Invitation
<b>Oct-Nov 2006</b> (3 semaines)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Mars 2006</b> (3 semaines)	Palembang & Bogor, Indonésie. Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie
<b>Novembre 2005</b> (1 semaine)	Kottayam et Cochin, Inde. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB. Invitation.
<b>Septembre 2005</b> (1 semaine)	Bogor, Indonésie. Proposition du Projet Intégration des biotechnologies pour l'amélioration de l'hévéa en Indonésie.
<b>Septembre 2004</b> (1 semaine)	Kunming, Yunnan. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB. Invitation.
<b>Février 2004</b> (1 semaine)	Kuala Lumpur, Malaisie. Workshop Biotechnology, IRRDB. Invitation
<b>Février 2004</b> (1 semaine)	Bogor et Jakarta, Indonésie. Discussion sur la mise en place d'une collaboration entre le CIRAD et l'IBRIEC, et identification de sources de financement
<b>Septembre 2003</b> (1 semaine)	Chang Mai, Thaïlande. Conférence internationale sur le caoutchouc, réunions IRRDB. Invitation.
<b>Mai 2003</b> (1 semaine)	Kottayam, Inde. Discussion sur la mise en place d'une collaboration entre le CIRAD et le RRII.
<b>Août 2002</b> (3 jours)	Haikou & Danzhou, Chine. Discussion sur la mise en place d'une collaboration entre le CIRAD et le CATAS.
<b>Février 2002</b> (1 semaine)	Kuala Lumpur, Malaisie. Réunion des <i>Liaison Officers</i> de l'IRRDB. Invitation.
<b>Oct 1995–Juin 2001</b>	Expatriation en Thaïlande.

## RESUME DES ACTIVITES D'ENCADREMENT

## ENCADREMENT D'ETUDIANTS EN FRANCE

Noms	Années	Cursus	Universités	Sujets	Encadrements
R. Putranto	2009	Master 1	Montpellier II	Etude du développement racinaire et sa plasticité sous stress hydrique chez <i>Hevea brasiliensis</i>	P. Montoro (encadrant) C. Jourdan (co-encadrant)
G. Nemrod	2008	Master 2	Toulouse	Étude de l'expression de gènes de réponse à l'éthylène chez trois clones d' <i>Hevea brasiliensis</i>	P. Montoro (encadrant)
Cuifang Duan	2008-2010	Doctorat	Montpellier II	Etude de l'interaction entre l'éthylène et le jasmonate chez <i>Hevea brasiliensis</i>	P. Montoro (directeur thèse)
M. Chabeau	2007	Licence 3	Montpellier II	Caractérisation de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez <i>Hevea brasiliensis</i> . Utilisation de la RT-PCR Quantitative	J. Leclercq (encadrant) P. Montoro (co-encadrant) F. Granet (co-encadrant)
Ayan Ayar	2007	Master Pro 2 BFP	Montpellier II	Caractérisation de lignées de cals et de plantes sur-exprimant la <i>CuZnSOD</i>	J. Leclercq (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
Kuswanhadi	2003-2006	Doctorat	Montpellier II	Isolement et la caractérisation des gènes de biosynthèse de l'éthylène	P. Montoro (encadrant) J. Tregear (directeur thèse)
S. Gramdi	2006	Master 1 BFP	Montpellier II	Caractérisation des gènes de réponse à l'éthylène par reverse Northern sur un clone à fort métabolisme PB 260 chez <i>Hevea brasiliensis</i>	P. Montoro (encadrant)
F. Taly	2006	Master 1 BFP	Montpellier II	Etude des facteurs biochimique impliqués dans la tolérance au stress oxydatif de l'hévéa en réponse à divers traitement	A. Clément-Vidal (encadrant) J. Leclercq (co-encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
V. Gébelin	2006	Master Pro 2 BFP	Montpellier II	Etude de l'expression de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez <i>Hevea brasiliensis</i> en réponse à différents traitements	J. Leclercq (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
M. Peyramard	2005	Master 1 BFP	Montpellier II	Préparation de vecteurs binaires permettant la surexpression de gènes afin d'améliorer la tolérance au stress oxydatif chez <i>Hevea brasiliensis</i>	J. Leclercq (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
C. Guilhaumon	2005	DESS GGTAV	Montpellier II	Caractérisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène par hybridation <i>in situ</i> chez l'hévéa	L. Alemanno (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
B. Marteaux	2004	DESS GGTAV	Montpellier II	Mise au point d'une technique d'hybridation <i>in situ</i> adaptée aux plantules et écorces d' <i>Hevea brasiliensis</i>	L. Alemanno (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
C. Lefrançois	2004	DESS GAR	Reims	Création d'une banque de gènes régulés par l'éthylène chez <i>Hevea brasiliensis</i>	F.C. Baurens (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
S. Lagier	2004	DESS GGTAV	Montpellier II	Caractérisation fonctionnelle de l'expression du gène rapporteur <i>uidA</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>HEV2.1</i> dans des cals friables et des plantules <i>in vitro</i> transgéniques chez <i>Hevea brasiliensis</i>	P. Montoro (encadrant)
N. Niemenak	2003-2004	Doctorat	Univ Yaoundé	Caractérisation du gène LEAFY COTYLEDON1-LIKE dans des embryons zygotiques et somatique chez <i>Theobroma cacao L.</i>	L. Alemanno (encadrant) P. Montoro (co-encadrant)
R. Vidal	2003	MST BAPV	Angers	Mise en évidence de l'expression des gènes GUS et de la glutamine synthétase dans les cals embryogènes d'hévéa.	P. Montoro (encadrant) L. Alemanno (co-encadrant)

Master BFP : Biologie fonctionnelle des plantes ; DESS-GGTAV : Génétique, génomique et technologies avancées des végétaux ; DESS GAR : Gestion des agro-ressources ; MST BAPV : Maîtrise des sciences et techniques en Biophysologie appliquée aux productions végétales

## VALORISATION SCIENTIFIQUE AVEC LES ETUDIANTS ENCADRES EN FRANCE

Noms	Années	Cursus	Universités	Valorisations avec les étudiants				
				Rapports	Publications (IC> 0,5)	Publications	Communications	Posters
G. Nemrod	2008	Master 2	Toulouse	[1]	[2]		[3]	
M. Chabeau	2007	Licence 3	Montpellier II	[4]			[5, 6]	
Ayan Ayar	2007	Master Pro 2 BFP	Montpellier II	[7]			[5, 6]	
Kuswanhadi	2003-2006	Doctorat	Montpellier II	[8]	[2, 9]		[3, 10-12]	[13]
S. Gramdi	2006	Master 1 BFP	Montpellier II	[14]				
F. Taly	2006	Master 1 BFP	Montpellier II	[15]				
V. Gébelin	2006	Master Pro 2 BFP	Montpellier II	[16]				
M. Peyramard	2005	Master 1 BFP	Montpellier II	[17]				
C. Guilhaumon	2005	DESS GGTAV	Montpellier II	[18]			[19]	
N. Niemenak	2003-2004	Doctorat	Univ. Yaoundé	[20]	[21]	[22]		
B. Marteaux	2004	DESS GGTAV	Montpellier II	[23]	[24]		[19] [25]	
C. Lefrançois	2004	DESS GAR	Reims	[26]	[3]			
S. Lagier	2004	DESS GGTAV	Montpellier II	[27]	[24]		[25]	
R. Vidal	2003	MST BAPV	Angers	[28]				

Master BFP : Biologie fonctionnelle des plantes ; DESS-GGTAV : Génétique, génomique et technologies avancées des végétaux

DESS GAR : Gestion des agro-ressources ; MST BAPV : Maîtrise des sciences et techniques en Biophysiology appliquée aux productions végétales

## VALORISATION SCIENTIFIQUE AVEC LES AGENTS ET LES ETUDIANTS ENCADRES A L'ETRANGER

Personnels encadrés	Périodes	Grades	Institutions de recherche	Unités recherche	Périodes projets	Publications	Communications
Throngpinich Puengraksa (Siriwongsilp)	1995-1996	Master, Assistante	Univ. de Mahidol	Dept Bioechnology	09/1995-06/1998		
Nongluk Teinseree	1996-1998	Bachelor, Assistante	Univ. de Mahidol	Dept Bioechnology	09/1995-06/1998		[29]
Nongluk Teinseree	1998-1999	Master, Assistante	Univ. de Kasetsart	KAPI	07/1998-06/2001	[30, 31]	[32-35]
Wiparat Rattana	1998-2001	Master, Chercheure	Univ. de Kasetsart	KAPI	07/1998-06/2001	[30, 31, 35, 36]	[33-35]
Sukuntaros Tadakittisarn	1999	Master, Chercheure	Univ. de Kasetsart	KAPI	07/1998-06/2001	[31, 36]	[34, 35]
Reena Kanthapura	1999-2001	Bachelor, Assitante	Univ. de Kasetsart	KAPI	07/1998-06/2001	[36]	[34, 35]
Saisunee Adunsadthapong	2000-2001	Bachelor, Assistante	Univ. de Kasetsart	KAPI	07/1998-06/2001	[36]	[34, 35]

## Références

1. Nemrod, G., *Comparaison de l'expression de gènes répondant à l'éthylène par PCR quantitative chez 3 clones d'hévéa à métabolisme contrasté*. 2008: Toulouse.
2. Montoro, P., et al., *Specific gene expression in response to ethylene and wounding in three clones of Hevea brasiliensis*. Tree Physiology, in preparation.
3. Montoro, P., et al. *Ethylene-regulated genes in Hevea brasiliensis: effect of ethylene and wounding in young budded plants of three clones with contrasting metabolisms*. in *IRRDB Natural Rubber Conference*. 2008. Kuala Lumpur, Malaysia.
4. Chabaud, M., *Caractérisation de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez Hevea brasiliensis PB260, PB217 et RRIM600. Utilisation de la RT-PCR Quantitative*, in *Biologie fonctionnelle de la plante*. 2007, Montpellier II: Montpellier, France. p. 20.
5. Leclercq, J., et al. *Etude de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif chez Hevea brasiliensis*. in *Biologie Moléculaire des Ligneux*. 2008. Nancy, France.
6. Leclercq, J., et al. *Over-expressing CuZnSOD gene for controlling oxidative burst in Hevea brasiliensis*. in *SFBV*. 2007. Versailles, France.
7. Ayar, A., *Caractérisation de lignées de cals et de plantes d'hévéa sur-exprimant la CuZnSOD*, in *Biologie fonctionnelle des plantes*. 2007, Montpellier II: Montpellier, France. p. 16.
8. Kuswanhadi, *Isolement et caractérisation des gènes ACS et ACO impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène chez Hevea brasiliensis*, in *Académie de Montpellier*. 2006, Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc. p. 146.
9. Kuswanhadi, et al., *Isolation of three members of the multigene family encoding ACC oxidase in Hevea brasiliensis and their response to ethylene stimulation and wounding*. Tree physiology, submitted.
10. Kuswanhadi, et al. *Clonage des gènes acs et aco en vue de la caractérisation de l'action de l'éthylène sur la production de caoutchouc naturel chez Hevea brasiliensis. Cloning of ACS and ACO genes in order to characterise ethylene action in natural rubber production from Hevea brasiliensis*. in *8ème Journées Biologie Moléculaire des Ligneux*. 2004. Clermont-Ferrand, France.
11. Kuswanhadi, et al. *Isolation and characterization of three members of the multigenic family encoding ACC oxidase from H. brasiliensis during plant development*. in *International Workshop on Tapping Panel Dryness of Rubber*. 2005. Cochin, Kerala, India.
12. Kuswanhadi, et al. *Identification of a multigene family encoding ACC Oxidase in Hevea brasiliensis*. in *International Natural Rubber Conference*. 2007. Siem Reap, Cambodia.
13. Kuswanhadi, et al., *Isolation and expression of ACO genes in Hevea brasiliensis*, in *Advances in Plant Ethylene Research*. 2006: Pisa, Italy.
14. Gramdi, S., *Characterization of ethylene-responsive genes by Reverse Northern on clone PB 260 in Hevea brasiliensis*, in *Génomique et technologies avancées des plantes*. 2006, Université Montpellier 2, Sciences et techniques / CIRAD: Montpellier. p. 17.
15. Taly, F., *Study of biochemical factors involved in tolerance to oxidative stress in Hevea brasiliensis in response to various stresses*, in *Génomique et technologies avancées des plantes*. 2006, CIRAD: Montpellier. p. 18.
16. Gébelin, V., *Etude de l'expression de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez Hevea brasiliensis en réponse à différents traitements*. 2006, CIRAD: Montpellier. p. 22.
17. Peyramard, M., *Préparation de vecteurs binaires permettant la surexpression de gènes afin d'améliorer la tolérance au stress oxydatif chez Hevea brasiliensis*, in *Génomique et technologies avancées des plantes*. 2005, UM2: Montpellier.
18. Guilhaumon, C., *Caractérisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène par hybridation in situ chez Hevea brasiliensis. Développement de techniques de localisation cellulaire de gènes faiblement exprimés*, in *Génomique et technologies avancées des plantes*. 2005, UM2: Montpellier.
19. Alemanno, L., et al. *Contributions of in situ hybridization of sRNA to the study on spatio temporal gene expression in Hevea brasiliensis*. in *International Rubber Research Development Board Conference*. 2005. Cochin, Kerala, India.
20. Niemenak, N., *Caractérisation du processus d'embryogenèse somatique du cacaoyer et du facteur de transcription Lec 1 like*. 2007, Université de Yaoundé: Yaoundé.
21. Alemanno, L., et al., *Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in Theobroma cacao L*. Planta, 2008. **227**(4): p. 853-66.
22. Montoro, P., et al., *Some genes expressed in Theobroma cacao L. zygotic and somatic embryos*. Ingenic Newletters, 2005(10): p. 8-10.

23. Marteaux, B., *Mise au point d'une technique d'hybridation in situ adaptées aux plantules et écorces d'Hevea brasiliensis. caractérisation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme laticifère*, in *Université Montpellier 2*. 2004, CIRAD: Montpellier. p. 22.
24. Montoro, P., et al., *Expression of the HEV2.1 gene promoter in transgenic Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008. **94**(1): p. 55-63.
25. Montoro, P., et al. *Characterization of the HEV2.1 promoter in transgenic Hevea brasiliensis calli and plants*. in *International Natural Rubber Conference*. 2006. Ho Chi Minh City, Vietnam.
26. Lefrançois, C., *Construction d'une banque d'ADNc enrichie en gènes régulés par l'éthylène par Suppression Subtractive Hybridization chez Hevea brasiliensis*. 2004, CIRAD: Reims.
27. Lagier, S., *Caractérisation fonctionnelle de l'expression du gène rapporteur gusA sous le contrôle du promoteur du gène hev au cours du développement de plants transgéniques chez Hevea brasiliensis*. 2004, Cirad: Montpellier. p. 65.
28. Vidal, R., *Mise en évidence de l'expression des gènes codant pour la  $\beta$ -glucuronidase et la glutamine synthétase dans des cals embryogènes d'hévéa. Etude anatomique des tiges d'hévéa en vue d'une caractérisation des gènes d'intérêt par hybridation in situ*. 2003, Rapport de Maîtrise de sciences et techniques.
29. Montoro, P., V. Pujade-Renaud, and N. Teinseree. *Strategy to study functionality of putative promotor from Hevea brasiliensis : attempts of Agrobacterium tumefaciens -mediated gene transfer in various tissues*. in *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. 1997. Bangkok, Thailand.
30. Montoro, P., et al., *Effect of exogenous calcium on Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer in Hevea brasiliensis (rubber tree) friable calli*. *Plant Cell Reports*, 2000. **19**(9): p. 851-855.
31. Rattana, W., et al., *Characterisation of factors involved in tissue growth recovery and stability of GUS activity in rubber tree (Hevea brasiliensis) friable calli transformed by Agrobacterium tumefaciens*. *Thai Journal of Agricultural Science*, 2001. **34**(3-4): p. 195-204.
32. Montoro, P., et al. *Stress and calcium both in somatic embryogenesis and Agrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer of rubber tree*. in *Plant genetic transformation and regulation of gene expression*. 1999. Mahidol University.
33. Montoro, P., et al. *Genetic engineering of rubber tree*. in *Annual RRIT meeting*. 1999. Hua Hin, Thailand.
34. Montoro, P., et al. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Hevea brasiliensis and production of transgenic callus lines*. in *Rubber Seminar*. 2001. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
35. Montoro, P., et al. *Production of transgenic callus lines in Hevea brasiliensis via Agrobacterium tumefaciens*. in *IRRDB Meeting: Heveaculture and biotechnology*. 2001. Montpellier-France: CIRAD.
36. Montoro, P., et al., *Production of Hevea brasiliensis transgenic embryogenic callus lines by Agrobacterium tumefaciens: roles of calcium*. *Plant Cell Reports*, 2003. **21**(11): p. 1095-1102.

## BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE



## Publications dans revues à facteur d'impact international/national

**Alemanno, L., Devic, M., Niemenak, N., Sanier, C., Guillemot, J., Rio, M., Verdeil, J. L. & Montoro, P. (2008).** Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta* **227**, 853-866.

**Blanc, G., Baptiste, C., Oliver, G., Martin, F. & Montoro, P. (2006).** Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Müll Arg. plants. *Plant Cell Reports* **24**, 724-733.

**Etienne, H., Montoro, P. & Carron, M.-P. (1991).** Incidence des paramètres hydriques sur le développement des cals d'*Hevea brasiliensis* en culture *in vitro*. *Annales des Sciences Forestières* **48**, 253-265.

**Etienne, H., Montoro, P., Michaux-Ferrière, N. & Carron, M.-P. (1993a).** Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* **44**, 1613-1619.

**Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E. & Carron, M. P. (1993b).** Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Science* **88**, 91-96.

**Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E. & Carron, M.-P. (1993c).** Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. during ontogenesis. *Plant Science* **92**, 111-119.

**Kuswanhadi, Leclercq, J., Alemanno, L., Rio, M., Tregear, J., Ducamp-Collin, M. N. & Montoro, P. (soumis).** Isolation of three members of the multigene family encoding ACC oxidase in *Hevea brasiliensis* and their response to ethylene stimulation and wounding. *Tree Physiology* **submitted**.

**Lardet, L., Martin, F., Dessailly, F., Carron, M.-P. & Montoro, P. (2007).** Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Cell Reports* **26**, 559-569.

**Lardet, L., Dessailly, F., Rio, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M. P. & Montoro, P. (soumis).** Development of an alternative procedure of long-term somatic embryogenesis using fragments of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Effect of physiological aging of the mother-tree on the morphogenic competence of tissues. *Plant Cell Reports* **Submitted**.

**Mollier, P., Montoro, P., Delarue, M., Bechtold, N., Bellini, C. & Pelletier, G. (1995).** Promotorless *gusA* expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by in planta infiltration method. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences* **318**, 465-474.

- Montoro, P., Etienne, H. & Carron, M.-P. (1994).** Embryogenèse somatique entretenue chez *Hevea brasiliensis*. *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales : le Botaniste* **17**, 113-119.
- Montoro, P., Etienne, H. & Carron, M.-P. (1995a).** Relation between nitrogen uptake, amino acid contents, and embryogenic intensity of rubber tree calli. *Journal of Plant Nutrition* **18**, 1693-1704.
- Montoro, P., Etienne, H. & Carron, M.-P. (1995b).** Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. : relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters;. *Journal of Experimental Botany* **46**, 255-261.
- Montoro, P., Etienne, H., Carron, M.-P. & Nougarede, A. (1992).** Effect of cytokinins on the induction of embryogenesis and the quality of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences: Série 3* **315**, 567-574.
- Montoro, P., H., E., Michaux-Ferriere, N. & Carron, M.-P. (1993).** Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**, 331-338.
- Montoro, P., Teinseree, N., Rattana, W., Kongsawadworakul, P. & Michaux-Ferriere, N. (2000).** Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. *Plant Cell Reports* **19**, 851-855.
- Montoro, P., Rattana, W., Pujade-Renaud, V., Michaux-Ferriere, N., Monkolsook, Y., Kanthapura, R. & Adunsadthapong, S. (2003).** Production of *Hevea brasiliensis* transgenic embryogenic callus lines by *Agrobacterium tumefaciens*: roles of calcium. *Plant Cell Reports* **21**, 1095-1102.
- Montoro, P., Lagier, S., Baptiste, C., Marteaux, B., Pujade-Renaud, V., Leclercq, J. & Alemanno, L. (2008).** Expression of the HEV2.1 gene promoter in transgenic *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **94**, 55-63.
- Montoro, P., Lefrançois, C., Gramdi, S., Nemrod, G., Baurens, F.-C., Leclercq, J., Rio, M., Sabau, X. & Argout, X. (in preparation).** Specific gene expression in response to ethylene and wounding in three clones of *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiology* **in preparation**.
- Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L., Arokiaraj, P., Jones, E., Ruengsrir, N., Chrestin, N., Tharreau, D., Montoro, P. & Narangajavana, J. (2005).** Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. *Biochimica et Biophysica Acta* **1727**, 151-161.

### Publications dans revues à comité de lecture international/national

**Carron, M.-P., d'Auzac, J., Etienne, H., El Hadrami, I., Housti, F., Michaux-Ferrière, N. & Montoro, P. (1992).** Biochemical and histological features of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Indian Journal of Natural Rubber Research* **5**, 7-17.

**Montoro, P., Niemenak, N., Rio, M. & Alemanno, L. (2005).** Some genes expressed in *Theobroma cacao* L. zygotic and somatic embryos. *Ingenic Newletters*, 8-10.

**Rattana, W., Teinseree, N., Tadakittisarn, S., Pujade-Renaud, V., Monkolsook, Y. & Montoro, P. (2001).** Characterisation of factors involved in tissue growth recovery and stability of GUS activity in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) friable calli transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Thai Journal of Agricultural Science* **34**, 195-204.

### Publications dans revues scientifiques sans comité de lecture international/national

**Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E. & Carron, M. P. (1994).** Régulateurs de croissance en embryogenèse somatique de l'hévéa. In *Repères : La culture in vitro des plantes tropicales*, pp. 31-35. Edited by CIRAD. Montpellier: CIRAD-Montpellier.

### Ouvrages ou chapitres d'ouvrage

**Carron, M.-P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N. & Montoro, P. (1995).** Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In *Biotechnology in Agricultural and Forestry*, pp. 353-369. Edited by Y. P. S. Bajaj. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag.

### Communications orales

**Alemanno, L., Guilhaumon, C., Marteaux, B., Conejero, G., Verdeil, J. L., Dessailly, F. & Montoro, P. (2005).** Contributions of in situ hybridization of sRNA to the study on spatio temporal gene expression in *Hevea brasiliensis*. In *International Rubber Research Development Board Conference*. Cochin, Kerala, India.

**Blanc, G., Baptiste, C., Martin, F., Oliver, G. & Montoro, P. (2004).** Efficient transformation and regeneration of PB 260 *Hevea* clone mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. In *Biotechnology Workshop 9-11 February 2004*. Edited by IRRDB. Sungei Buloh, Malaysia.

**Carron, M. P., Lardet, L. & Montoro, P. (2005).** Different ways of integrating in vitro culture in *Hevea* planting material propagation. In *International Rubber Research Development Board Conference*. Cochin, Kerala, India.

**Carron, M. P., Nurhaimi-Haris, Lardet, L., Caussanel, V., Keli, J., Dea, B. G., Leconte,**

**A., Sumarmadji & Montoro, P. (2007a).** Hevea Rootstock Clones Development. Building-up new varietal type: a multi-faceted challenge. In *International Rubber Conference and Exhibition*. Edited by IRRI. Bali, Indonesia.

**Carron, M. P., Lardet, L., Granet, F., Julien, J., Teerawatanasuk, K., Keli, J., Dea, B. G., Leconte, A. & Montoro, P. (2007b).** Fifteen years of field trials in different countries for the *in vitro* propagation of rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. ARG.) by several methods. In *III International symposium on acclimatization and establishment of micropropagated plants*. Faro, Portugal.

**Carron, M. P., Lardet, L., Granet, F., Julien, J., Teerawatanasuk, K., Keli, J., Dea, B. G., Leconte, A. & Montoro, P. (2007c).** Field trials network emphasizes the improvement of growth and yield through micropropagation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. ARG.). In *III International symposium on acclimatization and establishment of micropropagated plants*. Faro, Portugal.

**Carron, M.-P., Etienne, H. & Montoro, P. (1990).** Réunion du groupe d'étude de l'arbre. In *Groupe d'Etude de l'Arbre. - Montpellier : CIRAD-IRCA, 1990/05*.

**Carron, M.-P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N. & Montoro, P. (1994).** Improved somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) through historical and biochemical investigations. In *International congress of plant tissue and cell culture = [Congrès international sur les cultures de tissus et de cellules des végétaux]/IAPTC. - Rehovot : IAPTC, 1994/06 - p. 178 (1 p.)*.

**Carron, M.-P., Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Clément-Demange, A., Sumarmadji, Granet, F., Keli & Montoro, P. (2008).** The rejuvenated "bi-clones" in rubber tree - a new varietal type to take up the challenges of the future ? In *IRRDB Natural Rubber Conference*. Kuala Lumpur, Malaysia.

**Chantuma, P., Gohet, E., Lacote, R., Montoro, P., Prévôt, J.-C., Pujade-Renaud, V., Sri-arn, P. & Teerawatanasuk, K. (1999).** Application of molecular biology in relation to plant breeding and plant physiology of the rubber tree. In *Annual RRIT meeting*. Hua Hin, Thailand.

**Chrestin, H., Lacrotte, R., Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Kasaisewee, J., Naiyanetr, C. & Narangajavana, J. (1997a).** Towards a molecular diagnostic of yield potential and the genetic engineering of the rubber tree. In *Biochemical and Molecular Tools for Exploitation Diagnostic and Rubber Tree Improvement*, pp. VIII/1-VIII/3. Bangkok, Mahidol University.

**Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Narangajavana, J., Vichitcholchai, N., Teerawatanasuk, K. & Lacrotte, R. (1997b).** Cloning and expression of genes involved in coagulation and regeneration of latex : clonal variation and effects of yield stimulation with ethrel. In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. Bangkok, Thailand.

**Etienne, H., Montoro, P. & Carron, M. P. (1990).** Incidence des paramètres hydriques sur le métabolisme des cals d'hévéa en culture *in vitro*. In *Groupe d'Etude de l'Arbre*. INRA Nancy, France.

**Etienne, H., Montoro, P. & Carron, M.-P. (1991).** Effet des paramètres hydriques sur le métabolisme des cals d'*Hevea brasiliensis*. In *Groupe d'Etude de l'Arbre*. INRA-Nancy, France.

**Etienne, H., Montoro, P., Michaux-Ferrière, N. & Carron, M.-P. (1992).** Relation entre les régulateurs de croissance exogènes et les teneurs en AIA, ABA, ABA-GE pour l'expression de l'embryogenèse somatique chez *Hevea brasiliensis*. In *XI French Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Amiens, France.

**Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E. & Carron, M.-P. (1993).** Comparaison des teneurs endogènes en ABA et AIA chez des embryons somatiques et zygotiques d'*Hevea brasiliensis*. In *XII French Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Montpellier, France.

**Jacob, J.-L., Lacrotte, R., Prévôt, J.-C., Clement, A., Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Gohet, E., Gallois, R. & d'Auzac, J. (1997).** The laticiferous system of *Hevea brasiliensis*: description, functioning, ethylene stimulation ; the latex diagnosis and clonal typology for modern methods of exploitation. In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. Bangkok, Thailand.

**Kongsawadworakul, P., Pujade-Renaud, V., Chrestin, H., Montoro, P., Lacrotte, R. & Narangajavana, J. (1997).** Cloning and expression of genes involved in oxidative stress in the latex from TPD trees. In *The biochemical and molecular tools for exploitation diagnostic and rubber tree improvement*. Edited by M. University. Bangkok, Thailand.

**Kuswanhadi, Alemanno, L., Baurens, F. C., Sumarmadji & Montoro, P. (2004).** Clonage des gènes ACS et ACO en vue de la caractérisation de l'action de l'éthylène sur la production de caoutchouc naturel chez *Hevea brasiliensis*. Cloning of ACS and ACO genes in order to characterise ethylene action in natural rubber production from *Hevea brasiliensis*. In *8ème Journées Biologie Moléculaire des Ligneux*. Clermont-Ferrand, France.

**Kuswanhadi, Leclercq, J., Sumarmadji, Rio, M., Alemanno, L. & Montoro, P. (2005).** Isolation and characterization of three members of the multigenic family encoding ACC oxidase from *H. brasiliensis* during plant development. In *International Workshop on Tapping Panel Dryness of Rubber*. Cochin, Kerala, India.

**Kuswanhadi, Leclercq, J., Alemanno, L., Rio, M., Tregear, J., Ducamp-Collin, M.-N. & Montoro, P. (2007).** Identification of a multigene family encoding ACC Oxidase in *Hevea brasiliensis*. In *International Natural Rubber Conference*. Edited by IRRDB. Siem Reap, Cambodia.

**Lacrotte, R., Jacob, J.-L., Chrestin, H., Pujade-Renaud, V. & Montoro, P. (1997a).** Biochemical and histological aspects of necrotic and induced Tapping Panel Dryness (TPD). In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. Bangkok, Thailand.

**Lacrotte, R., Vichitcholchai, N., Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Kosaisawee, J., Srisarn, P., Narangajavana, J., Montoro, P. & Gidrol, X. (1997b).** Latex diagnostic and molecular markers of the Tapping Panel Dryness (TPD). In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. Bangkok, Thailand.

- Lardet, L., Martin, F., Chapuset, T., Carron, M. P. & Montoro, P. (2006).** Establishment of a cryopreservation process for long-term storage of embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). In *International Natural Rubber Conference*. Ho Chi Minh City.
- Lardet, L., Benistant, E., Leclercq, L., Martin, F. & Montoro, P. (2008a).** Variabilité de l'expression du gène *gusA* chez les plants transformés de première génération chez *Hevea brasiliensis*. In *Biotec 2008*. Edited by INRA. Rennes, France.
- Lardet, L., Bénistant, E., Leclercq, J., Martin, F., Oliver, G. & Montoro, P. (2008b).** Comparison of GUS activity in self-rooting and budded primary transformant plants in *Hevea brasiliensis*. In *IRRDB Natural Rubber Conference*. Edited by MRB. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Leclercq, J., Martin, F. & Montoro, P. (2006).** Shortening genetic transformation procedure by using green fluorescent protein marker. In *International Natural Rubber Conference*, pp. 5. Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Leclercq, J., Martin, F., Lardet, L., Rio, M. & Montoro, P. (2007a).** Genetic transformation and regeneration of plant over-expressing CuZnSOD gene to control oxidative stress in rubber tree. In *International Natural Rubber Conference*. Edited by C. IRRDB. Siem Reap, Cambodia.
- Leclercq, J., Martin, F., Lardet, L., Rio, M., Gebelin, V., Chabaud, M., Ayar, A. & Montoro, P. (2007b).** Over-expressing CuZnSOD gene for controlling oxidative burst in *Hevea brasiliensis*. In *SFBV*. Versailles, France.
- Leclercq, J., Gébelin, V., Martin, F., Lardet, L., Rio, M., Chabaud, M., Ayar, A. & Montoro, P. (2008).** Etude de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif chez *Hevea brasiliensis*. In *Biologie Moléculaire des Ligneux*. Edited by INRA. Nancy, France.
- Montoro, P. (2004).** Developments in natural rubber biotechnologies compared to other major tropical crops in a globalization context. In *International Rubber Research Development Board Annual Meetings and Conference*, pp. 73-88. Kunming, China.
- Montoro, P., Pujade-Renaud, V. & Teinseree, N. (1997a).** Strategy to study functionality of putative promotor from *Hevea brasiliensis* : attempts of *Agrobacterium tumefaciens* - mediated gene transfer in various tissues. In *The Biochemical and Molecular Tools for Exploitation and Diagnostic and Rubber Tree Improvement*. Bangkok, Thailand.
- Montoro, P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N. & Carron, M.-P. (1992).** Embryogenèse somatique entretenue chez *Hevea brasiliensis*. In *XI French Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Amiens, France.
- Montoro, P., Sri-arn, P., Rattana, W., Tadakittisarn, S. & Pujade-Renaud, V. (1999a).** Genetic engineering of rubber tree. In *Annual RRIT meeting*. Hua Hin, Thailand.
- Montoro, P., Carron, M.-P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N. & Teinseree, N. (1999b).** Stress and calcium both in somatic embryogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer of rubber tree. In *Plant genetic transformation and regulation of gene*

*expression*. Mahidol University.

**Montoro, P., Carron, M. P., Lardet, L., Clément-Demange, A. & Leclercq, J. (2007a).** Biotechnologies & rubber tree (*Hevea brasiliensis*). In-vitro manipulation of rubber tree. Towards the production of new varietal types for rubber plantation and tolerance to oxidative stress in latex cells. In *Thai Rubber Conference*. Edited by K. University. Bangkok, Thailand.

**Montoro, P., Carron, M. P., Lardet, L., Clément-Demange, A. & Leclercq, J. (2007b).** Biotechnologies in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). In *Asian Pacific Conference on Tissue Culture and Agribiotechnology*. Kuala Lumpur, Malaysia, June 17-21.

**Montoro, P., Blanc, G., Carron, M. P., Lardet, L., Pujade-Renaud, V. & Seguin, M. (2004).** Biotechnology activities at CIRAD. In *Workshop on Biotechnology*. Edited by IRRDB. Sungei Buloh, Malaysia.

**Montoro, P., Lagier, S., Baptiste, C., Marteaux, B., Pujade-Renaud, V., Leclercq, J. & Alemanno, L. (2006).** Characterization of the HEV2.1 promoter in transgenic *Hevea brasiliensis* calli and plants. In *International Natural Rubber Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam.

**Montoro, P., Carron, M. P., Lardet, L., Clément-Demange, A., Leclercq, L., Chen, X. & Monteuiis, O. (2007c).** Biotechnologies and new planting material for rubber tree plantation. In *International Rubber Conference and Exhibition*. Edited by IRRI. Bali, Indonesia.

**Montoro, P., Carron, M.-P., Clément-Demange, A., Jourdan, C., Nurhaimi-Haris, Sumarmadji & Sumaryono (2008a).** Integration of biotechnologies for rubber tree improvement. What about rootstock clones? In *IRRDB Workshop on Plant Material*. Edited by IRIEC. Bogor, Indonesia.

**Montoro, P., Rattana, W., Teinseree, N., Tadakittisarn, S., Pujade-Renaud, V., Michaux-Ferrière, N., Monkolsook, Y., Kanthapura, R. & Adunsadthapong, S. (2001a).** Production of transgenic callus lines in *Hevea brasiliensis* via *Agrobacterium tumefaciens*. In *IRRDB Meeting: Heveaculture and biotechnology*. Montpellier-France: CIRAD.

**Montoro, P., Rattana, W., Teinseree, N., Tadakittisarn, S., Pujade-Renaud, V., Michaux-Ferrière, N., Monkolsook, Y., Kanthapura, R. & Adunsadthapong, S. (2001b).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Hevea brasiliensis* and production of transgenic callus lines. In *Rubber Seminar*, pp. 1-19. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

**Montoro, P., Chow, K. S., Kouadio, D., Lekawipat, N., Li, Z., Sumarmadji, Taniwiryono, D., Thulaseedhararn, A. & Withanage, S. P. (2007d).** Recent advances on biotechnology in rubber tree. In *International Natural Rubber Conference*. Edited by C. IRRDB. Siem Reap, Cambodia.

**Montoro, P., Gramdi, S., Kuswanhadi, Lefrançois, C., Nemrod, G., Argout, X., Baurens, F.-C., Leclercq, J., Rio, M. & Sabau, X. (2008b).** Ethylene-regulated genes in *Hevea brasiliensis*: effect of ethylene and wounding in young budded plants of three clones with contrasting metabolisms. In *IRRDB Natural Rubber Conference*. Edited by M. R.

Board. Kuala Lumpur, Malaysia.

**Montoro, P., Jacob, J.-L., Pujade-Renaud, V., Chrestin, H., Lacote, R., Kongsawadworakul, P., Narangajavana, J., Carron, M. P., Teerawatanasuk, K., Seguin, M., Teinseree, N., Rattana, W., P., P. & Srisa-arn, P. (1999c).** The rubber tree biotechnology for the improvement of the productivity. In *Regional seminar on plant biotechnology for agricultural-based economy in the third millenium*. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

**Pujade-Renaud, V., Montoro, P. & Phuangkosol, N. (1997).** Cloning of latex-specific and ethylene-inducible promoters from rubber tree. In *The biochemical and molecular tools for exploitation diagnostic and rubber tree improvement*. Bangkok-Thailand: Mahidol Univrsity.

**Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Kongsawadworakul, P., Romruensukharom, P., Narangajavana, J. & Chrestin, H. (2000).** Cloning of potentially ethylene-inducible and/or laticifer-specific promoters from *Hevea brasiliensis*. In *6th International Congress of Plant Molecular Biology*. Québec, Canada.

**Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L., Tharreau, D., Puangkosol, N., Montoro, P., Chrestin, H. & Narangajavana, J. (2004).** Specific promoters for genetic engineering of rubber trees; molecular and functional analysis. In *IRRDB Biotechnology Workshop*, pp. 45-52. Kuala Lumpur, Malaysia.

### Affiches [Poster]

**Montoro, P., Pagant, S., Giband, M., Michaux-Ferriere, N., Triaire, L., Tourneur, J., Mollier, P., Bechtold, N., Voisin, R., Pannetier, C., Chupeau, Y. & Pelletier, G. (1997b).** Trapping and isolation of a phloem-specific promotor from *Arabidopsis thaliana*. [Poster]. In *Internaltional Plant Molecular Biology Conference*. Singapore: IMBP.

**Kuswanhadi, Leclercq, J., Sumarmadji, Rio, M. & Montoro, P. (2006).** Isolation and expression of ACC oxidase in *Hevea brasiliensis* [Poster]. In *7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene*. Pisa, Italy.

### Rapports diplômant

**Montoro, P. (2007).** Accréditation à diriger des recherches. SIBAGHE, Montpellier, p. 29.

**Montoro, P. (1998).** Report to obtain the grade of Advisor-Professor. In Department of Agronomy, Faculty of Agriculture. Kasetsart University, Bangkok, Thailand, p. 19.

**Montoro, P. (1993).** Etablissement de cultures embryogènes en suspension chez *Hevea brasiliensis* (Muell.Arg.) : incidence des facteurs du milieu sur l'histogenèse des cals, leur friabilité et l'expression de l'embryogenèse. Université Montpellier 2.



## Rapports de veille scientifique

Participation au **Plan Action PGM** (plantes génétiquement modifiées) du CIRAD.

## Séquences publiées dans les bases de données internationales

La liste des séquences ADNc pleines longueurs et ADN génomique d'hévéa (HbACS1, HACO1, HbACO2 et HbACO3) et des EST de cacaoyer a été publiée dans les revues suivantes :

**Kuswanhadi, J. Leclercq, L. Alemanno, M. Rio, J. Tregear, M.N. Ducamp-Collin and P. Montoro 2007a.** Isolation of three members of the multigene family encoding ACC oxidase in *Hevea brasiliensis* and their response to ethylene stimulation and wounding. Submitted to *Tree Physiol.*

**Montoro, P., Niemenak, N., Rio, M. A. & Alemanno, L. (2005).** Some genes expressed in *Theobroma cacao* L. zygotic and somatic embryos. *Ingenic Newletters*, 8-10.

## RESUME DES TRAVAUX

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 Mécanismes de défense au sein des tissus de l'écorce chez *Hevea brasiliensis*

Le manteau laticifère de l'hévéa est considéré comme une véritable usine à produire du caoutchouc naturel. Il est formé à la suite d'anastomoses entre cellules laticifères secondaires différenciées à partir du cambium au sein du phloème. Ce système constitue un modèle original pour étudier le processus de différenciation des cellules laticifères et les mécanismes de défense de la plante.

L'écorce des espèces ligneuses est composée du phloème secondaire et du périoderme qui sont différenciés à l'extérieur du cambium vasculaire. Le périoderme constitue une couche subérisée qui protège et isole les tissus sous-jacents. En sus de cette protection, le latex produit par les cellules laticifères est riche en protéines de défense et en métabolites secondaires possédant des propriétés antimicrobiennes et entomotoxiques. L'écoulement de latex représente donc un deuxième niveau de défense contre la blessure au niveau de différents organes. La coagulation des particules de caoutchouc permet ensuite d'obstruer la zone blessée.

L'exploitation de l'hévéa pour le caoutchouc naturel nécessite la mise en œuvre de la saignée et pour certains clones l'application d'éthéphon. Ce dernier permet de prolonger l'écoulement du latex et stimule le métabolisme des cellules laticifères nécessaire à la régénération de son contenu cellulaire entre deux saignées. Ces stress d'exploitation peuvent conduire à des réponses plus ou moins profondes au niveau du fonctionnement des tissus de l'écorce : en premier lieu l'encoche sèche de saignée (coagulation *in situ* des particules de caoutchouc) puis la formation d'une lame brune dans les tissus de l'écorce. L'étude de ces mécanismes de défense a fortement motivé l'orientation de mes travaux.

## 1.2 Axes de recherche

La saignée et la stimulation à l'éthéphon induisent divers mécanismes physiologiques et moléculaires favorables à la production de latex. Au-delà d'une certaine fréquence de saignées et de stimulation, des dysfonctionnements cellulaires apparaissent et engendrent un arrêt de production. Les voies de signalisation de la blessure et de l'éthylène activent des facteurs susceptibles de coordonner des réseaux de gènes de réponse. La régulation des systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène (ROS) constitue une réponse majeure en termes de stress oxydatif ou de signalisation secondaire qui peuvent induire la dégénérescence cellulaire ou indirectement la coagulation des particules de caoutchouc. Les voies de signalisation et les systèmes de détoxification des ROS ont donc représenté les deux axes principaux de recherche pour la tolérance aux stress d'exploitation.

Le modèle d'étude développé depuis 2003 dans l'équipe BURST est le plant greffé avec une unité de croissance. Cultivé en conditions contrôlées, il permet d'obtenir des données reproductibles en termes d'expression génique en réponse à l'éthylène et à la blessure. La comparaison de trois clones à métabolisme contrasté vise à identifier les divers modes de

régulation et de réponse de l'hévéa. La signalisation de la blessure par le jasmonate a été intégrée récemment dans notre étude. Ainsi, les voies de biosynthèse et de signalisation des deux hormones, éthylène et jasmonate, et certains gènes clés impliqués dans la réponse cellulaire (biosynthèse de caoutchouc naturel, détoxification des radicaux libres, protéines de défense, etc.) sont caractérisés en réponse aux stress chez ces 3 clones. La démarche de génétique inverse entreprise a reposé sur la caractérisation fonctionnelle de gènes identifiés par une approche transcriptomique sur l'hévéa ou à partir des connaissances acquises sur les espèces modèles. Le développement de procédés de clonage par embryogenèse somatique et de transformation génétique, et l'acquisition de ressources moléculaires ont donc constitué une étape importante de ma carrière.

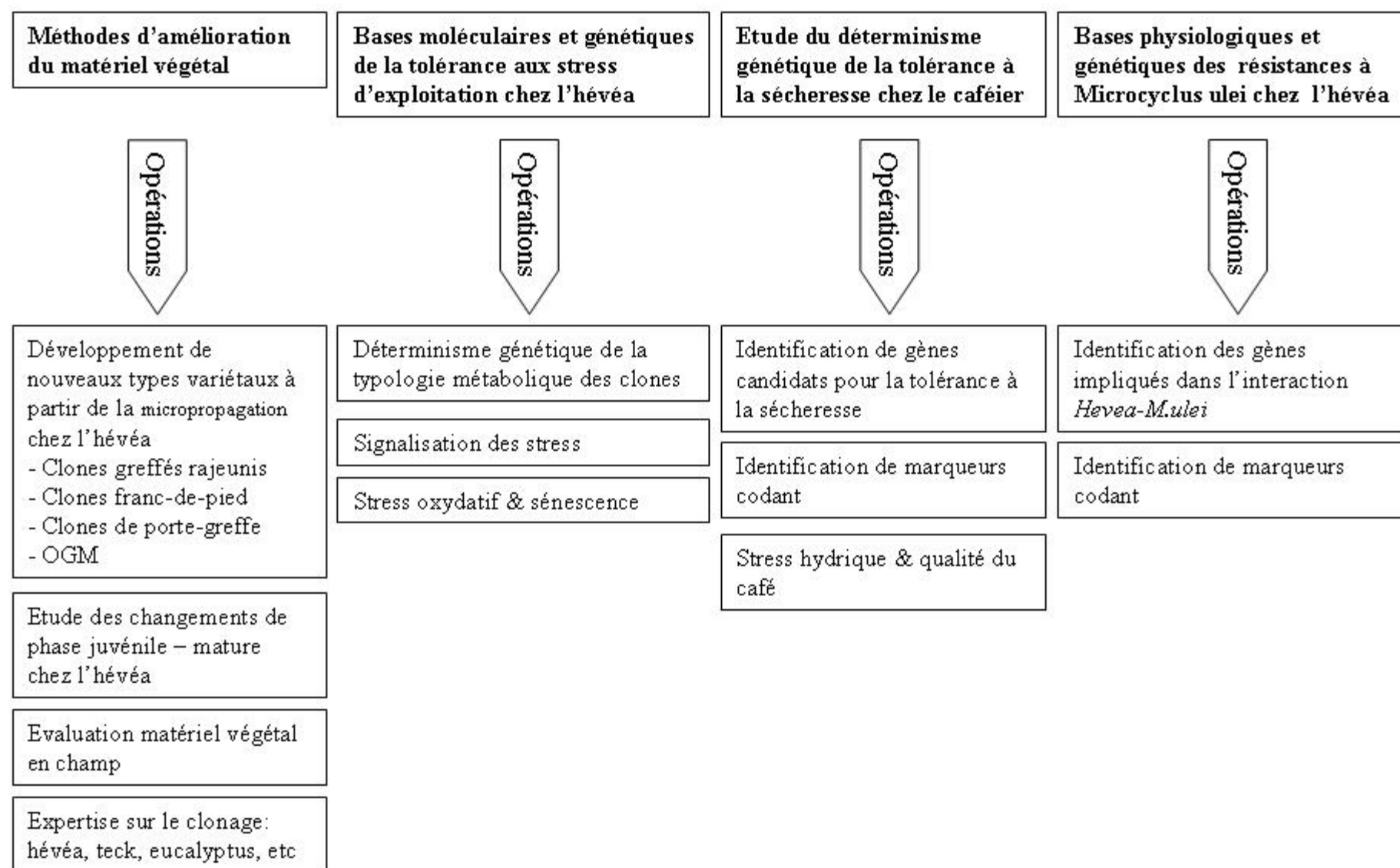
### **1.3 Organisation des compétences et des opérations de recherche**

Depuis 2007, j'anime l'équipe BURST (Biologie cellulaire et moléculaire de la réponse aux stress). Son projet scientifique porte sur les mécanismes de défense contre les stress biotiques et abiotiques afin d'identifier des critères de sélection et des gènes clés utiles à l'amélioration variétale de plusieurs espèces arborescentes tropicales (Figure 1). La transgénèse est utilisée pour l'étude fonctionnelle de gènes impliqués dans la signalisation de la blessure et de l'éthylène, et la tolérance au stress oxydatif chez l'hévéa. L'analyse des transcriptomes vise l'identification de gènes candidats liés aux changements de phase juvénile/mature, à la tolérance aux stress d'exploitation et d'une maladie de feuille chez l'hévéa, et au stress hydrique chez le caféier. Dans une perspective d'intensification écologique répondant aux évolutions climatiques et économiques, ces gènes et les QTLs associés aux principaux facteurs génétiques de tolérance représenteront des paramètres essentiels aux programmes de génétique d'association portés par l'UMR DAP et nos partenaires du sud.

### **1.4 Articulation du résumé des travaux**

Cette synthèse de mes travaux s'articule en cinq parties. La première retrace mon travail en embryogenèse somatique principalement chez l'hévéa mais aussi chez le cacaoyer. La seconde porte sur la transformation génétique du cotonnier pour la résistance aux insectes et la mise au point d'un procédé chez l'hévéa utilisé aujourd'hui pour l'analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans les mécanismes de la production de caoutchouc naturel. La troisième reprend l'ensemble des études que j'ai encadrées sur les systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène. La quatrième résume les activités menées sur la biosynthèse et la réponse à l'éthylène. Enfin, la dernière partie décrit les travaux récemment entrepris sur l'étude de l'interaction entre l'éthylène et le jasmonate, hormone de signalisation de la blessure.

**Figure 1.** Organisation des opérations de recherche menées par l'équipe BURST autour de la réponse aux stress biotiques et abiotiques chez différentes espèces pérennes tropicales.



## 2 EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Le clonage de l'hévéa n'est pas trivial. C'est une espèce arborescente à croissance rythmique acropète à forte dominance apicale et récalcitrante à la culture *in vitro*. Ces caractéristiques ont limité son clonage soit par bouturage soit par micropropagation.

Les hévéas sélectionnés sont clonés par greffage sur des porte-greffes issus de semis non sélectionnés. Malgré le clonage de la partie aérienne, la variabilité génétique du porte-greffe et celle enregistré au niveau de l'interaction porte-greffe/greffon maintient une hétérogénéité intra-clonale de croissance et de production des arbres. Les techniques de clonage *in vitro*, microbouturage et embryogenèse somatique, ont été initialement développées pour régénérer des plants franc-de-pied appelés communément vitroplants ou plus précisément microboutures pour la première technique et somaplants pour la seconde. L'utilisation de ce matériel aux caractères juvéniles en jardin à bois permet aussi de produire un autre type variétal : le clone greffé rajeuni. J'ai démarré ma carrière sur la mise au point de procédés d'embryogenèse somatique chez l'hévéa.

### 2.1 Amélioration de l'embryogenèse somatique primaire chez l'hévéa

Le CIRAD a initié en 1979 des travaux sur la mise au point d'un procédé de régénération par embryogenèse somatique (Carron, 1982). L'utilisation d'explant de tégument interne de graine d'origine génétique maternelle a rendu possible le clonage d'arbres élités. Cette technique d'embryogenèse somatique sur cal primaire ne permettant pas de régénérer régulièrement des embryons, j'ai participé à l'amélioration des conditions de culture. Au niveau de la phase de callogenèse, certains paramètres ont été étudiés comme le statut hydrique (Etienne *et al.*, 1991), et les apports hormonaux (Etienne *et al.*, 1993c; Montoro *et al.*, 1992) et en minéraux (Montoro *et al.*, 1995a). Au niveau de l'ontogenèse des embryons somatiques, le même type d'étude a été réalisé (Etienne *et al.*, 1993a; Etienne *et al.*, 1993b).

Outre les publications scientifiques, ces travaux ont donné lieu à deux publications de synthèse (Carron *et al.*, 1992; Etienne *et al.*, 1994) et un chapitre d'ouvrage (Carron *et al.*, 1995a).

Ces améliorations m'ont permis de régénérer des plants chez quatre clones cultivés (PB 260, PR 107, RRIM 600 et PB 235), et ce protocole a été appliqué jusqu'à neuf clones dans notre laboratoire. Ces vitroplants de « première génération » ont été évalués sur leur croissance et leur production de latex dans des essais au champ menés en Côte d'Ivoire en collaboration avec le CNRA. Ils montrent une nette supériorité de ce nouveau matériel végétal par rapport aux plants greffés conventionnels (Carron *et al.*, 1995b). Cela valide la qualité des travaux faits en amont sur l'amélioration de la technique d'embryogenèse somatique primaire. Toutefois, le faible rendement de production de vitroplants et l'utilisation de fruits immatures disponibles qu'une seule fois par an ne permettent pas d'utiliser cette technique pour la propagation de masse des clones sélectionnés d'hévéa. Toutefois, le rajeunissement apporté par l'embryogenèse somatique a été exploité pour établir des jardins à bois rajeunis chez plusieurs clones. Ces clones greffés rajeunis ont des caractéristiques supérieures aux plants greffés avec du matériel clonal conventionnel (Carron *et al.*, 2007). En ce qui concerne la

propagation de masse de clones entiers par embryogenèse somatique, les objectifs ont été orientés vers l'obtention de lignées de cal friable embryogène proliférant.

## **2.2 Obtention de cal friable embryogène et établissement de cultures entretenues en milieu semi-solide ou liquide chez l'hévéa**

La stratégie pour la propagation de masse a consisté à obtenir des lignées conservant le potentiel embryogène, soit sous forme de cal friable, soit sous forme de cultures en suspension. Parmi les différents composants du milieu de culture testés, l'augmentation de la concentration en calcium a été essentielle à l'obtention d'un cal friable conservant son potentiel embryogène (Montoro *et al.*, 1993). L'établissement de cultures entretenues à long terme a pu être relativement aisé à partir de ce type de cal (Montoro *et al.*, 1994). Des études biochimiques et physiologiques ont permis de préciser le rôle du calcium sur la friabilité des cals et sur l'embryogenèse somatique (Montoro *et al.*, 1995b).

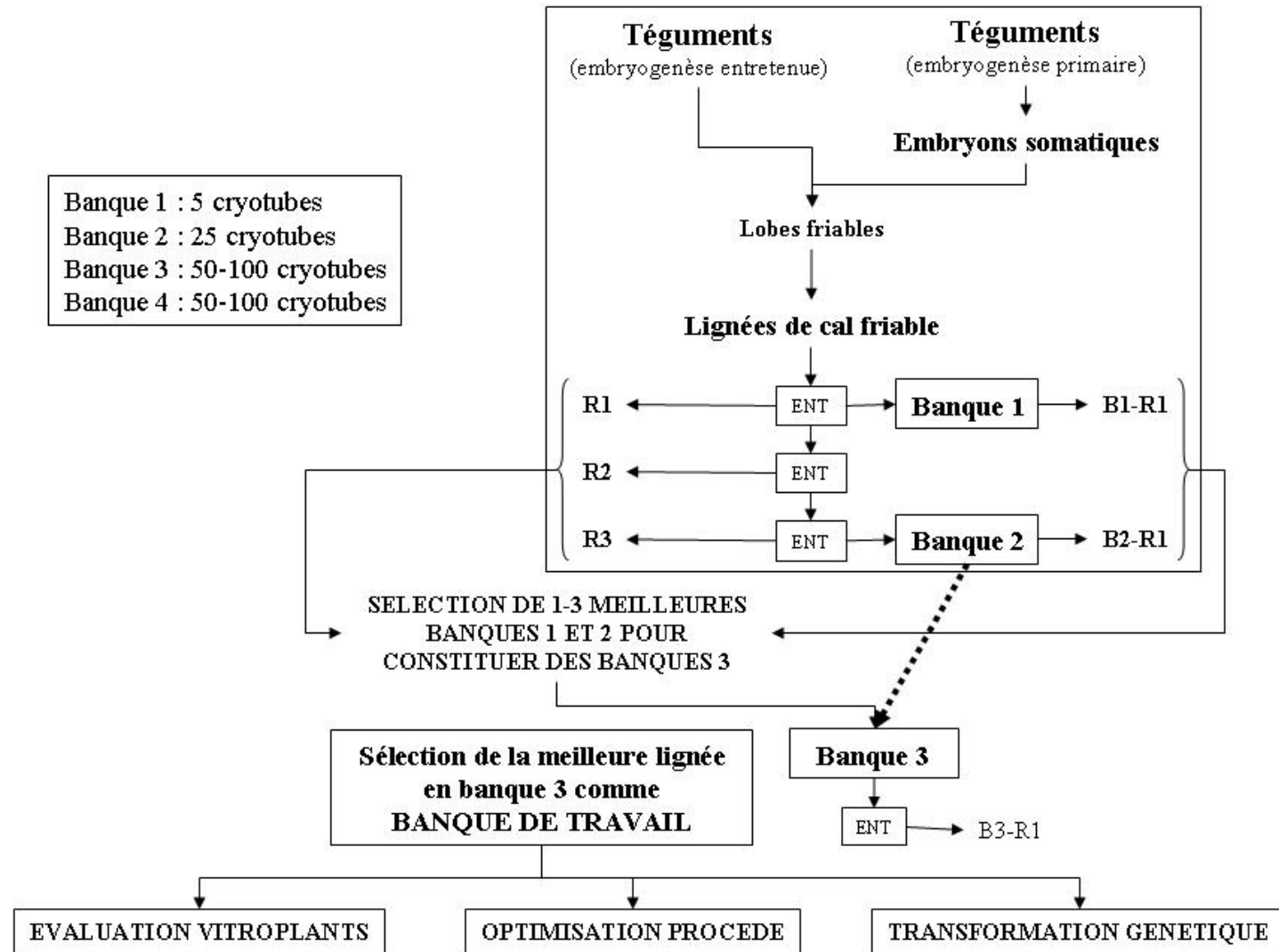
La poursuite de ces travaux par l'équipe de culture *in vitro* de l'hévéa au CIRAD en collaboration avec plusieurs partenaires (Michelin, Institut de recherche sur le caoutchouc en Thaïlande, CNRA en Côte d'Ivoire) a permis d'évaluer en champ la qualité de ces vitroplants dits de « deuxième génération ». Le constat reste mitigé car ces plants produits en grande quantité montrent une forte hétérogénéité dans leur croissance, des anomalies foliaires et de façon générale sont inférieurs aux plants greffés. Un bilan a été fait en 2002 lors de ma prise de fonction en tant que chef d'équipe et j'ai proposé une réorientation de ces études.

## **2.3 Nouvelle stratégie visant la cryoconservation précoce des lignées de cal friable embryogène chez l'hévéa**

La mauvaise qualité de plants issus d'embryogenèse somatique entretenue pouvait avoir de multiples causes. La longue période d'établissement des lignées de cal friable induit un stress prolongé sous pression hormonale. Enfin, la multiplication des cals sur le long terme implique de nombreuses divisions cellulaires successives.

Suite à ce bilan, j'ai mis en place en 2003 une démarche au niveau de l'équipe visant la cryoconservation précoce de lignées de cal nouvellement établies pour fixer leur potentiel de régénération, et le criblage des meilleures lignées embryogènes pour établir un cryo-conservatoire (Figure 2). Une méthode de cryoconservation des cals friables embryogènes et une voie alternative de production de cal friable embryogène à partir de fragments d'embryons somatiques avaient été développées ultérieurement (Lardet *et al.*, 2007; Lardet *et al.*, soumis). De nouvelles lignées embryogènes ont été établies sous différentes conditions de cultures et ont été aussitôt cryoconservées afin de réduire les risques de variations somaclonales liés aux apports hormonaux et à la durée de prolifération des tissus. La caractérisation de 46 lignées nouvellement établies a permis de révéler 26 lignées embryogènes dont 3 montrant des niveaux de régénération de plants équivalents aux meilleures lignées obtenues antérieurement. D'importants stocks de cryoconservats ont été produits afin de s'assurer de la disponibilité de ce matériel pendant plusieurs décennies.

**Figure 2.** Démarche pour l'établissement et la caractérisation de banques cryoconservées chez le clone PB 260





Ces stocks maintenus en cryoconservation sont utilisés à la fois pour l'amélioration des différentes étapes du processus de régénération, pour la production de vitroplants dits de « 3<sup>ème</sup> génération » qui sont évalués en champ depuis 2007, et enfin pour la transformation génétique.

## 2.4 Expériences chez d'autres espèces végétales

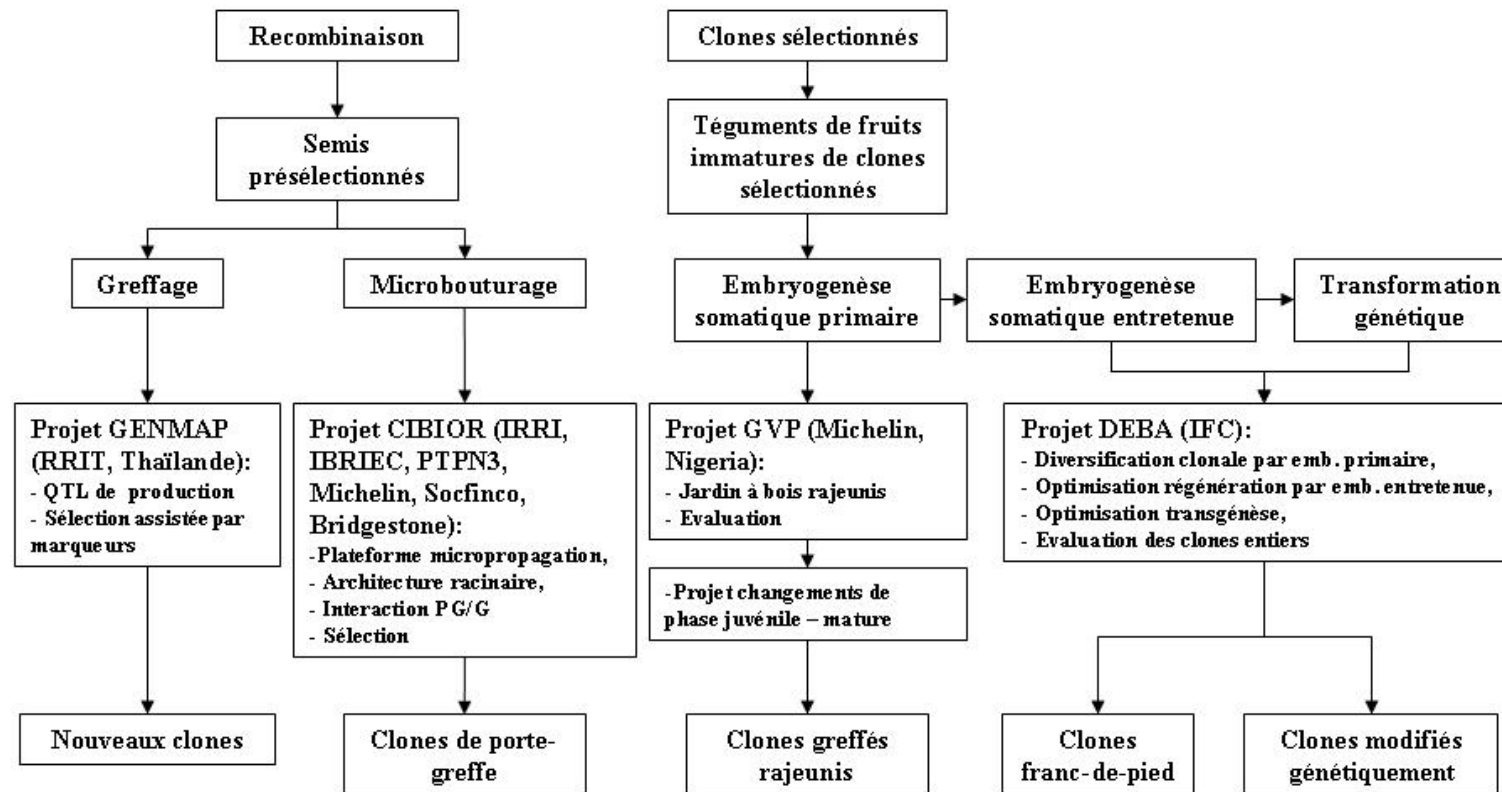
En sus d'une expérience acquise chez le cotonnier lors d'un stage postdoctoral, j'ai participé à une étude du développement embryonnaire chez le cacaoyer. Ce travail a été réalisé en partie dans le cadre du co-encadrement d'un chercheur camerounais, Nicolas Niemenak, qui préparait sa thèse de doctorat d'état.

Les gènes *LEC1* et *LEC2* sont considérés chez *Arabidopsis* comme des régulateurs transcriptionnels pouvant conduire à l'établissement d'un environnement cellulaire favorable à l'initiation du développement embryonnaire. La surexpression de ces gènes entraîne la production d'embryons somatiques à partir de cellules somatiques. Plusieurs séquences ADNc partielles ont été isolées chez le cacaoyer (Montoro *et al.*, 2005). Un ADNc pleine longueur homologue au gène *LEC1-like* a ensuite été isolé (clone TcLec140B1) et caractérisé chez le cacaoyer (Alemanno *et al.*, 2008). Sa séquence de 920 pb comporte une phase ouverte de lecture de 639 pb. Les transcrits *TcLIL* s'accumulent dans les embryons zygotiques immatures et moins chez les somatiques. La localisation des transcrits par hybridation *in situ* montre une spécificité d'expression dans les cellules embryonnaires, protodermiques et épidermiques des embryons immatures, et les cellules méristématiques des tiges et apex racinaires. Les tissus non-embryogènes n'expriment pas le gène *TcLIL*. Dans le cadre d'une collaboration avec Martine Devic (Univ-CNRS, Perpignan), la complémentation d'un mutant déficient pour cette fonction a été réalisée. L'expression ectopique de *TcLIL* permet de récupérer partiellement le phénotype d'un mutant *lec1* d'*Arabidopsis* ce qui suggère une similarité de fonction en embryogenèse zygotique.

## 2.5 Conclusions

Les outils biotechnologiques développés chez l'hévéa au cours de ce parcours professionnel m'ont conduit à renforcer et réorganiser les projets avec les partenaires privés (Michelin et IFC (Institut Français du Caoutchouc)) et publics (IRRI, IBRIEC, CATAS). L'objectif finalisé est d'améliorer la production de caoutchouc naturel de l'hévéa par la voie des biotechnologies à travers la mise à disposition de nouveaux types variétaux plus performants issus de la micropropagation (Figure 3).

**Figure 3.** Organisation des projets de recherche menés par l'équipe BURST autour de la production de différents types variétaux chez l'hévéa.



### **3 TRANSFORMATION GENETIQUE**

#### **3.1 Transformation génétique du cotonnier pour la résistance aux insectes ravageurs**

Dans le cadre des travaux menés conjointement par le CIRAD et l'INRA sur la production de cotonniers transgéniques résistants aux insectes ravageurs, j'ai effectué un stage postdoctoral sur la recherche de promoteurs pour diriger l'expression de gènes codant des toxines de *Bacillus thuringiensis* ou des inhibiteurs de protéases chez le cotonnier. Ainsi, j'ai criblé plusieurs milliers d'accession de la collection de mutants d'insertion *gusA* sans promoteur d'arabette établie à l'INRA de Versailles. Bien qu'aucun promoteur fruit spécifique n'ait été trouvé à cette époque, un gène exprimé tardivement lors de la maturation du pollen et deux promoteurs spécifiques l'un des vaisseaux conducteurs et l'autre du phloème ont été isolés (Mollier *et al.*, 1995). La caractérisation du promoteur spécifique du phloème a été conduite par transgénése chez le tabac et l'arabette (Montoro *et al.*, 1997a). Parallèlement, j'ai caractérisé deux promoteurs des gènes *WIN1* et *WIN2*. Cependant, ces promoteurs se sont avérés avoir un faible niveau d'induction dans des plants transgéniques de tabac insuffisant pour diriger l'expression de gènes codant des protéines entomotoxiques. Ces études ont été poursuivies par un étudiant en thèse.

#### **3.2 Transformation génétique de l'hévéa pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production de latex et la tolérance aux stress d'exploitation**

Le développement d'une méthode efficace de transformation génétique de l'hévéa s'inscrit dans le cadre des études de physiologie moléculaire sur les mécanismes liés à la production de latex. Dès 1995 en Thaïlande, j'ai travaillé à l'université de Mahidol sur la mise au point d'une méthode de transformation transitoire sur différents tissus (tégument, cal, feuille, tige) (Montoro *et al.*, 1997b). De 1998 à 2001, j'ai encadré une équipe de l'université de Kasetsart avec laquelle j'ai développé un procédé de transformation stable à partir de lignées de cal friable embryogène chez le clone PB 260.

La méthode consiste à inoculer sur un temps très court des lignées de cal embryogène avec la souche *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 comportant le plasmide binaire pCAMBIA2301. Les cals sont préalablement cultivées sur un milieu de culture appauvri en calcium afin de favoriser le transfert de gène (Montoro *et al.*, 2000). Une série de conditions favorables au développement du cal (report de la sélection des cellules transgéniques, optimisation des concentrations hormonales et en agent bactéricide, réduction de la taille des agrégats cellulaires repiqués) sont nécessaires à la reprise de croissance du cal après transformation et tout particulièrement à celle des cellules transgéniques (Rattana *et al.*, 2001). Le contrôle de la reprise de croissance a permis d'aboutir à l'établissement des premières lignées de cal transgénique (Montoro *et al.*, 2003). A partir de 2002, j'ai travaillé au CIRAD successivement avec un post-doctorant et deux étudiants en Master. L'utilisation

d'une lignée de cal embryogène plus performante et de conditions de co-culture à température réduite a conduit à l'établissement de 19 lignées 35S::GUS et la régénération de plusieurs centaines de plants (Montoro *et al.*, 2006).

La localisation d'une protéine recombinante dans un tissu cible permet de réduire son impact métabolique au niveau de la plante entière. Le ciblage de l'expression des transgènes a été alors envisagé avec le promoteur du gène *HEV 2.1* codant l'hévéine. Après une première analyse fonctionnelle dans des plants transgéniques de riz (Pujade-Renaud *et al.*, 2005), quatorze lignées transgéniques indépendantes ont été caractérisées chez l'hévéa (Montoro *et al.*, 2008b). La localisation par hybridation *in situ* de l'expression du gène natif dans des plants sauvages ou du gène rapporteur *gusA* sous le contrôle du promoteur *HEV 2.1* dans des plantes transgéniques a conduit à confirmer l'expression spécifique de ce gène dans les laticifères des tiges et des racines. Par contre, l'expression est globale au niveau des tissus de la feuille. Ce résultat est cohérent avec l'analyse de la séquence du promoteur qui contient plusieurs boîtes de réponse à la lumière et l'induction de ce promoteur par la lumière dans les cals habituellement cultivés à l'obscurité (Lagier, 2004).

Fort de cette avancée et d'un financement sur cinq ans, j'ai obtenu le recrutement d'une chercheuse, Julie Leclercq, pour m'aider à développer les études fonctionnelles sur des gènes clés. Le programme actuel vise :

- L'optimisation du système de sélection des cellules transgéniques en raccourcissant la phase d'établissement des lignées. La visualisation du marqueur GFP à chaque repiquage permet une sélection plus efficace qui, à terme, permettra de s'affranchir de l'utilisation de test histochimique GUS et de la sélection par antibiotique (Leclercq *et al.*, 2006).
- Le choix d'un mode de propagation des plants transgéniques permettant de produire du matériel végétal homogène. En effet, la croissance des plants issus d'embryogenèse somatique est hétérogène. Les voies de propagation par greffage ou microbouturage sont à l'étude (Lardet *et al.*, 2008a ; Lardet *et al.*, 2008b).
- Le développement d'une méthode d'extinction de l'expression génique par ARN interférence. L'extinction des gènes rapporteurs (*gusA* et *GFP*) et un gène endogène *PDS* (*phytoène desaturase*) sera réalisée au préalable.
- La création de lignées transgéniques surexprimant des gènes de défense contre le stress oxydatif (*Cu-ZnSOD*, *GCL*) ou affectées dans la perception de l'éthylène (Leclercq *et al.*, 2007a ; Leclercq *et al.*, 2007b; Leclercq *et al.*, 2008).

## 4 LUTTE CONTRE LE STRESS OXYDATIF DANS LES LATICIFERES

### 4.1 Systèmes de détoxification des espèces activées de l'oxygène chez l'hévéa

L'hévéa est constamment soumis à des contraintes liées à l'environnement (température, disponibilité en eau, attaque par des agents pathogènes, etc.) et à l'exploitation du latex (saignée, stimulation avec de l'éthéphon). Ces contraintes engendrent une forte production d'espèces activées de l'oxygène (ROS). Lorsqu'un déséquilibre survient entre la synthèse des

ROS et l'efficacité des systèmes de détoxification, intervient un stress oxydatif qui se traduit par la déstabilisation de l'intégrité des membranes cellulaires. Au niveau de cellules laticifères, les activités NADPH oxydase, présente à la surface des lutoïdes, et superoxyde dismutase sont plus élevées chez les arbres exploités produisant peu de latex que chez les sains. Cet arrêt de l'écoulement du latex est du à la libération du contenu des lutoïdes. L'hévéine, une agglutinine lutoïdique, entraîne une coagulation *in situ* des particules de caoutchouc (Gidrol *et al.*, 1994).

Deux voies de détoxification cohabitent pour lutter contre l'accumulation des ROS dans la cellule. La première implique des enzymes du cycle ascorbate-glutathion pour réduire successivement les espèces activées de l'oxygène (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, etc.) en eau. La seconde, non enzymatique, produit des composés antioxydants tels que le glutathion, l'ascorbate ou les caroténoïdes. Les travaux menés sur ce sujet à l'institut de biologie moléculaire de Singapour puis à l'université de Mahidol ont été abandonnés à partir de 1998. Considérant que le système antioxydant représenté une réponse cellulaire essentielle permettant la défense contre les stress environnementaux et d'exploitation, j'ai repris en 2003 ces travaux à travers la caractérisation des gènes de défense en réponse à la blessure et au traitement éthylénique chez trois clones à métabolisme contrasté et dans des plantes transgéniques sous ou sur-exprimant des gènes candidats. Ces études ont été confiées dès 2005 à Julie Leclercq avec qui j'ai co-encadré plusieurs étudiants en Master.

Plusieurs séquences de gènes impliqués dans les voies de détoxification des ROS (*ROS-scavenging system*) ont été soit obtenues à la suite du projet auquel j'ai participé à l'université de Mahidol (*MnSOD*, *Cu/ZnSOD*), soit isolées dans des banques EST (*CAT*, *APX1*, *APX2*, *DHAR*) ou encore par clonage avec des amorces dégénérées (*GCLchl*, *GCLcyt*). Une expression différentielle des gènes *MnSOD*, *Cu/ZnSOD* et *CAT* a été observée à analyse en PCR à temps réel chez trois clones (PB 217, RRIM 600 et PB 260) en réponse à la blessure et la stimulation éthylénique (Chabaud, 2007). Sur le plan biochimique, il existe une certaine homéostasie des systèmes de détoxification au cours de la journée (Taly, 2006). Par contre, un traitement à l'éthylène ou un stress hydrique entraîne une augmentation de la concentration en antioxydants alors que les activités enzymatiques de détoxification tendent à diminuer. La *Cu/ZnSOD* se révélerait être un bon candidat pour l'amélioration de la tolérance au stress hydrique (Gébelin, 2006).

## 4.2 Production de lignées transgéniques modifiées pour les systèmes de détoxification des ROS

Parallèlement, des vecteurs de transformation ont été préparés avec les gènes cibles *Cu/ZnSOD* et  $\gamma$ ECS isolés respectivement chez l'hévéa et *E. coli* (Peyramard, 2005). Cinquante lignées transgéniques 35S::CuZnSOD ont été isolées. Le niveau d'expression du gène *CuZnSOD* est très variable dans ces lignées et peut atteindre cent fois celui observé dans les lignées sauvages de cal embryogène, mais aucun phénomène d'inactivation n'est observé (Ayar, 2007). Dans les plantes transgéniques, l'expression de la *CuZnSOD* atteint des niveaux 78 à 400 fois supérieurs à ceux enregistrés dans des plantes témoins sauvages ou transformées avec des gènes rapporteurs uniquement. Les premières analyses phénotypiques en réponse à divers traitements sont en cours d'analyse dans les plantes transgéniques régénérées (Leclercq *et al.*, 2008).

### 4.3 Etude des différents niveaux de régulation du stress oxydatif

Le premier niveau de contrôle de la régulation des gènes, probablement le plus important, se fait au niveau de la transcription. Cependant, les régulations post-transcriptionnelles jouent aussi un rôle crucial dans la finesse de la régulation. Des résultats récents indiquent que les micro ARNs sont impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Un projet de thèse va démarrer sur ce sujet. Les miARNs en réponse à de stress abiotiques seront isolés chez des vitroplants d'hévéa et leurs séquences analysées avec l'aide du programme Patscan par rapport à celle d'espèces modèles. Les cibles des miARNs pour les gènes impliqués dans la détoxification des ROS seront identifiées à partir des séquences d'ESTs disponibles chez l'hévéa. Les miARNs liés à la régulation du système de détoxification seront analysés plus en détails par PCR en temps réel. Les données générées seront associées à des données biochimiques et écophysiologiques pour une meilleure connaissance des mécanismes fins de régulation du stress oxydatif et de la tolérance aux stress abiotiques.

## 5 CARACTERISATION DES GENES DE BIOSYNTHESE ET DE REPONSES A L'ETHYLENE CHEZ *HEVEA BRASILIENSIS*

### 5.1 Rôle de l'éthylène chez l'hévéa

L'éthylène joue un rôle majeur dans la stimulation de la production du caoutchouc naturel chez l'hévéa. La biosynthèse de l'éthylène est catalysée par l'ACC synthase et l'ACC oxydase chez les plantes. Ces enzymes sont codées par des familles multigéniques chez beaucoup d'espèces végétales. Leurs expressions sont régulées par des signaux développementaux, en réponse à des facteurs environnementaux, des régulateurs de croissance, l'attaque d'agents pathogènes ou la blessure. L'application d'éthéphon, un générateur d'éthylène, sur le panneau de saignée de l'hévéa est pratiquée depuis plusieurs décennies pour prolonger l'écoulement et activer la régénération du latex entre deux saignées. Dans certains cas, de sensibilité clonale ou de fréquence de stimulation trop élevée, cette activation peut conduire à l'encoche sèche qui est un arrêt de l'écoulement par coagulation intra-laticifère des particules de caoutchouc. Dans des cas extrêmes, il y a un brunissement des tissus de l'écorce appelé lame brune ou *brown bast*.

### 5.2 Biosynthèse de l'éthylène

Le rôle de l'éthylène exogène et de la blessure sur la régulation des gènes de biosynthèse de d'éthylène a été étudié dans le cadre d'une thèse dont j'ai assuré l'encadrement, James Tregear étant le directeur de thèse (Kuswanhadi, 2006). Les travaux sur l'isolement et la caractérisation ont donné lieu à une projet de publication (Kuswanhadi *et al.*, submitted) et plusieurs communications (Kuswanhadi *et al.*, 2004; Kuswanhadi *et al.*, 2005; Kuswanhadi *et al.*, 2006; Kuswanhadi *et al.*, 2007).

Trois gènes codant une ACC oxydase (*HbACO1*; *HbACO2* ; *HbACO3*) et un codant une ACC synthase (*HbACSI*) ont été identifiés et caractérisés. Les séquences d'ADNc *HbACOs* ont respectivement une taille de 1115, 1183 et 1348 pb, avec une phase ouverte de lecture (ORF)



codant pour des polypeptides de 312, 318 et 318 acides aminés. Les structures des deux séquences génomiques caractérisées, *HbACO1* et *HbACO2*, sont différentes. En effet, *HbACO1* comportent 3 introns et 4 exons alors que *HbACO2* possèdent 2 introns et 3 exons. La région génomique du troisième membre *HbACO3* n'est pas entièrement isolée. En ce qui concerne *HbACSI*, le clone ADNc pleine longueur est de 1932 pb avec une ORF codant un polypeptide de 480 acides aminés. La séquence génomique correspondante est d'une taille de 2928 pb avec une structure à 3 introns et 4 exons.

Tous les gènes *HbACO* sont exprimés avec des profils très différents selon les stades de développement étudiés du jeune plant à l'arbre exploité. L'expression de ces gènes n'est pas détectable dans le latex et les cals cultivés *in vitro*. Le gène *HbACO1* est exprimé à un niveau de base plus élevé que les autres gènes. Son expression décroît après traitement à l'éthylène ou après la blessure à la fois dans les feuilles et les écorces. Les gènes *HbACO2* et *HbACO3* sont au contraire sur-exprimés transitoirement en réponse au même traitement. Pour *HbACSI*, l'expression est induite à la fois par l'éthylène et la blessure. Un pré-traitement au 1-méthylcyclopropène (1-MCP), un inhibiteur de l'action de l'éthylène, inhibe la sur-expression des gènes *HbACSI* et *HbACO2* induite par l'éthylène. Cela tend à démontrer que ces gènes sont sous une régulation positive de l'éthylène.

En conclusion, les résultats obtenus permettent de proposer que le gène *HbACO1* est impliqué dans la production d'un niveau de base d'éthylène et régulé négativement par des signaux environnementaux, tandis que les gènes *HbACSI*, *HbACO2* et *HbACO3* ne sont exprimés qu'en réponse aux facteurs externes. Un modèle de travail présentant le rôle potentiel de ces gènes sur la régulation de la biosynthèse d'éthylène et la régénération du latex a été proposé (Kuswanhadi, 2006).

### 5.3 Localisation de l'expression des gènes de biosynthèse de l'éthylène par hybridation *in situ*

Avec l'appui de trois étudiants en Master, les transcrits des gènes *HbACO1* et *HbACO3* ont été localisés dans tous les tissus de l'écorce par hybridation *in situ*. Une méthode d'hybridation *in situ* des ARNm a été adaptée aux tissus de l'hévéa contenant du latex et une forte activité phosphatase endogène à partir de matériel transgénique (expression du gène *gusA*) sous le contrôle de deux promoteurs forts, celui de l'ARN CaMV 35S (Vidal, 2003), et celui du gène codant l'hévéine chez l'hévéa (Marteaux, 2004). L'étude des gènes de biosynthèse de l'éthylène a requis une amélioration de la sensibilité de la technique avec une amplification du signal de marquage par l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes de type Alexa488 (Guilhaumon, 2005). La déconvolution spectrale a permis de soustraire à la fluorescence observée l'autofluorescence enregistrée au préalable dans les tissus contrôles.

Cette nouvelle méthode a permis de mettre en évidence une expression des gènes *HbACO1* et *HbACO3* dans tous les tissus d'écorce de tige, en particulier dans les cellules laticifères (Kuswanhadi, 2006). Par contre, aucune expression n'a été détectée pour *HbACO2*. Ce système a permis d'amplifier le marquage et de localiser très finement l'expression des gènes *ACO*. Bien que fonctionnelle, l'utilisation de sondes plus courtes spécifiques dans la région 3'UTR de chaque membre des *ACO* n'a pas permis de faire une localisation différentielle de ces 3 gènes sur une même coupe.

## 5.4 Gènes régulés par l'éthylène

Avec l'aide de trois étudiants en Master, l'expression de gènes régulés par l'éthylène a été étudiée par *Reverse Northern*. Des profils d'expression spécifiques de trois clones d'hévéa à métabolisme contrasté ont été observés en réponse à l'éthylène (Montoro *et al.*, 2008a ; Montoro *et al.*, in preparation).

Cent-cinquante-huit transcrits uniques ont été identifiés à partir de 2 banques SSH issus d'écorce d'arbres adultes non stimulés ou stimulés à l'éthéphon (Lefrançois, 2004). A cette collection, 31 gènes impliqués dans le métabolisme laticifère ont été ajoutés sur un filtre à haute densité. Les analyses de l'expression de ces 189 gènes par *Reverse Northern* montrent que l'accumulation de transcrits augmentent de plus de 2 fois après stimulation éthylénique pour un grand nombre de gènes chez le clone PB 260. Le comportement de ce clone à métabolisme actif s'oppose à celui des clones à métabolisme intermédiaire (RRIM 600) ou lent (PB 217) pour qui la stimulation tend à réprimer l'expression de la majorité des gènes, l'expression des autres gènes étant stable (Gramdi, 2006). Ce travail met en évidence trente-cinq gènes candidats marqueurs potentiels de la réponse précoce au traitement éthylénique. Parmi ces gènes, cinq ont des niveaux de réponse à l'éthylène spécifiques qui permettent de discriminer le comportement des trois clones.

L'expression de ces « marqueurs d'expression » a été validée par RT-PCR à temps réel. L'accumulation des transcrits des gènes *HbPIP-like* et *HSP70* sous certaines conditions de stress permet de discriminer les trois clones (Nemrod, 2008). Suite à la mise au point d'une technique de *real-time* RT-PCR à haut débit en plaque 384, une stratégie d'identification et de validation de marqueurs d'expression pour la sélection précoce a été proposée et pourrait faire l'objet d'un projet de thèse mené en collaboration avec l'Institut de recherche sur le caoutchouc en Thaïlande (projet GENMAP).

## 5.5 Dissection des phénomènes dépendants ou non de l'éthylène

L'insensibilité à l'éthylène due à la mutation dominante *etr1-1* chez *Arabidopsis* a été exploitée chez plusieurs espèces. ETR1 est un récepteur de type protéine histidine kinase de 147 kDa à deux composantes (Moeder *et al.*, 2002; Schaller & Bleecker, 1995 ). La mutation qui rend les plantes insensibles à l'éthylène élimine à la fois la liaison avec l'éthylène et l'interaction du cuivre avec le récepteur (Rodriguez *et al.*, 1999). Une mutation par délétion permet d'éliminer l'activité Histidine kinase qui pourrait exercer un rôle dans la dominance (Gamble *et al.*, 2002). Des plantes transgéniques sur-exprimant le gène ETR1 récepteur de l'éthylène portant la mutation dominante *etr1-1* montrent une insensibilité à l'éthylène chez l'arabette (Chang *et al.*, 1993), mais aussi chez la tomate (Wilkinson *et al.*, 1997), chez *Kalanchoe blossfeldiana* (Sanikhani *et al.*, 2008) ou le bouleau (*Betula pendula*) (Bustamante-Porras *et al.*, 2007; Ruonala *et al.*, 2006). En marge de la maîtrise de l'application des inhibiteurs 1-MCP et DIECA, des lignées transgéniques sur-exprimant le gène *Atetr1-1* seront produites et caractérisées chez l'hévéa.



## 6 INTERACTION ENTRE L'ETHYLENE ET LE JASMONATE

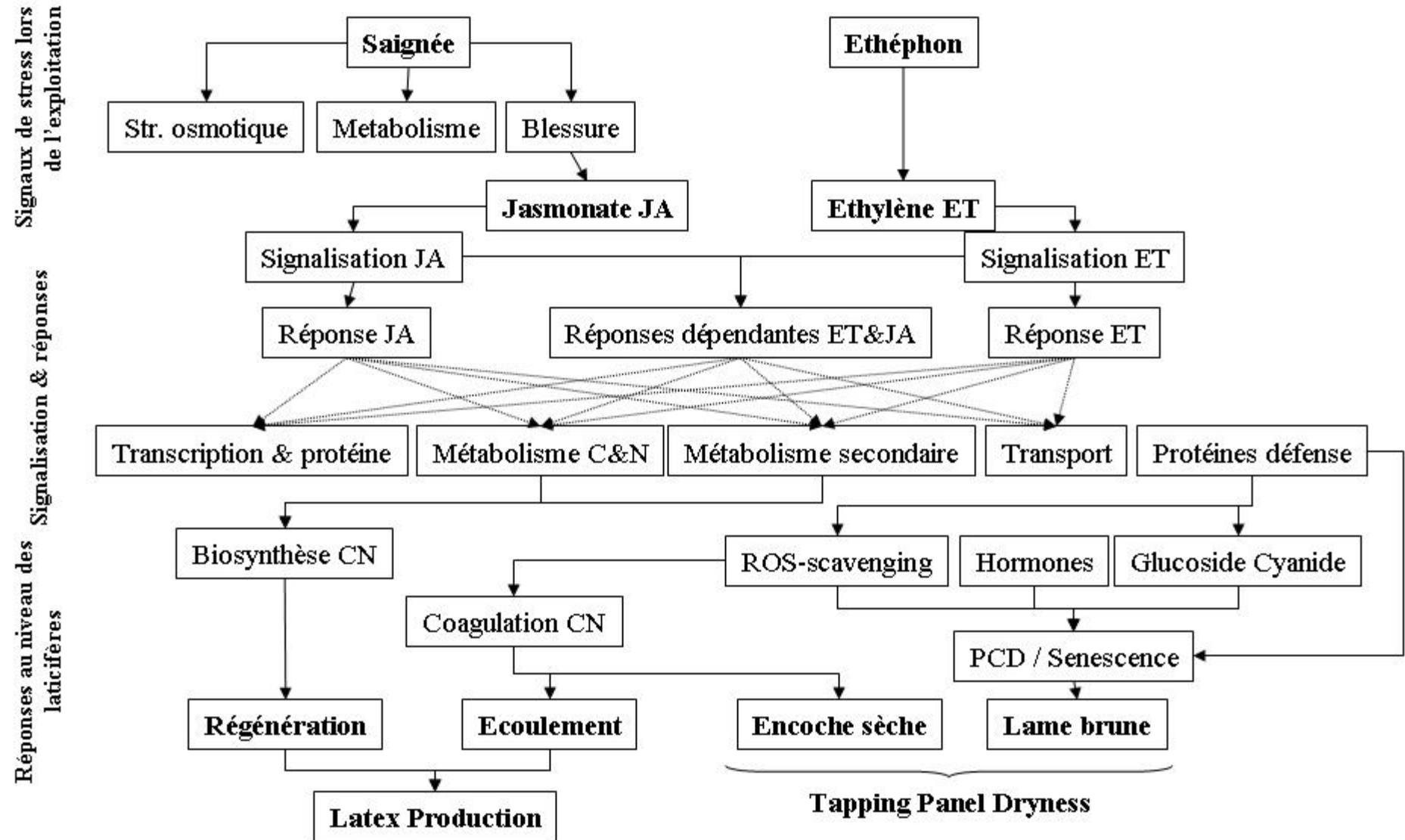
Toutes les réponses développementales et aux stress demandent une interaction coordonnée entre le jasmonate et les autres voies de signalisation telles que celles de l'éthylène, de l'acide salicylique et l'acide abscissique (Lorenzo & Solano, 2005). Les récentes avancées chez *Arabidopsis* ont permis de découvrir plusieurs facteurs clés qui régulent la communication entre ces voies de signalisation. Les gènes impliqués dans la stabilité des protéines par la voie ubiquitine-protéasome (COI1, AXR1 et SGT1b), les protéines de signalisation (MPK4) et les facteurs de transcription (AtMYC2, ERF1, NPR1 et WRKY70) forment un réseau de régulation qui permet une réponse fine et spécifique à chaque stimulus.

Depuis 2003, je mène des travaux sur la signalisation des stress de saignée et de stimulation à l'éthéphon chez l'hévéa utilisant les outils de la transcriptomique et de la caractérisation fonctionnelle des gènes candidats. En 2007, j'ai obtenu une accréditation à diriger une thèse confiée à une doctorante chinoise, Cuifang Duan. Son sujet de thèse est l'étude de l'interaction entre l'éthylène et le jasmonate

La saignée perturbe sévèrement les tissus de l'écorce. De manière générale, la saignée réduit la croissance des arbres impliquant l'effet progressif de puits des laticifères (Silpi *et al.*, 2006). Plusieurs niveaux de stress sont produits tels que la blessure, le stress osmotique (écoulement du latex, flux d'eau intra-laticifère) et l'activation métabolique pour faire face à la régénération du latex entre deux saignées et celle de l'écorce. La saignée induit la production d'éthylène endogène (Siwei *et al.*, 1986), mais probablement aussi d'autres hormones telles que l'acide jasmonique (JA) et l'acide abscissique (ABA). L'effet de la saignée ou de la blessure sur la différenciation des laticifères a été rapportée depuis longtemps (Hao & Wu, 1982). Plus récemment, il a été démontré que la blessure ou JA activent la différenciation des laticifères secondaires (Hao & Wu, 2000 ; Wu *et al.*, 2002). La réponse à la blessure passant par la synthèse de JA, la caractérisation des gènes de biosynthèse de JA a été abordée par plusieurs équipes (Duan, 2004; Duan *et al.*, 2005a; Duan *et al.*, 2005b; Norton *et al.*, 2007). Toutefois, la biosynthèse et la signalisation de JA restent encore mal décrites chez l'hévéa.

L'action de l'éthéphon passe par la libération d'éthylène qui diffuse au sein de tissus pour activer le métabolisme et la production d'antioxydants favorables respectivement à la régénération et à l'écoulement du latex. Bien que l'éthylène et l'acide salicylique n'interagiraient pas avec le JA pour déclencher la différenciation des laticifères (Liu *et al.*, 2001), l'interaction entre l'éthylène et le JA est suspectée dans la régulation des mécanismes de défense et la production de latex. Un premier modèle de travail a été proposé pour décrire les signaux et les réponses enregistrées au niveau des laticifères en liaison avec la production de caoutchouc naturel (Figure 4).

**Figure 4.** Modèle de travail représentant les signaux et les réponses enregistrées au niveau des laticifères en liaison avec la production de caoutchouc naturel (CN) et le syndrome d'encoche sèche.



## 6.1 Organisation de la famille des ERF chez *Hevea brasiliensis*

La famille *Ethylene Responsive Factor* (ERF) code des facteurs de transcription impliqués dans une variété de processus développementaux, physiologiques et de réponse à des stimuli environnementaux chez les plantes. Cette famille appartient à la super-famille AP2/ERF qui englobe aussi les familles AP2 et RAV (Riechmann *et al.*, 2000). La famille ERF est divisée en deux sous-familles majeures : la sous-famille des ERF et celle des CBF/DREB (Sakuma *et al.*, 2002). Le domaine ERF est un motif conservé chez 4 protéines de liaison à l'ADN, *ethylene-responsive element binding proteins 1, 2, 3, 4* (EREBP1, 2, 3 et 4) couramment appelé ERF1, 2, 3 ou 4. Ce motif se lie spécifiquement à la boîte GCC localisée dans les promoteurs des gènes de réponse à l'éthylène (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995; Ohme-Takagi *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2000). Un grand nombre de gènes contenant le domaine AP2/ERF a été identifié chez l'arabette (145 gènes), le peuplier (200 gènes) ou le soja (98 gènes) (Sakuma *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 2008 ). Chez *Arabidopsis*, 83% de ces gènes, soit 121, appartiennent à la famille des ERF (Sakuma *et al.*, 2002). Les ERF peuvent être classés en groupe fonctionnel (Nakano *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, les groupes enrichis en facteurs de transcription ERF/AP2, tels que les groupes II et VIII, sont reliés à la stimulation par l'éthylène ou le jasmonate. La disponibilité de nombreuses données de séquences EST chez l'hévéa permet d'entreprendre une comparaison des séquences comportant le domaine ERF/AP2 afin de classer celles pouvant jouer un rôle majeur dans la réponse aux stress.

## 6.2 Expression hétérologue du gène *AtERF1* dans des plants transgéniques d'hévéa

Les gènes *ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (ERF) sont différenciellement régulés par l'éthylène et les stress abiotiques tels que la blessure, le froid, la salinité ou la sécheresse, *via* des voies dépendantes ou indépendantes de l'ETHYLENE-INSENSITIVE2 (EIN2) chez *Arabidopsis*. Les AtERF sont des facteurs de réponse aux signaux extracellulaires pour moduler positivement ou négativement l'expression des gènes comprenant une boîte GCC (Fujimoto *et al.*, 2000). AtERF1, AtERF2 et AtERF5 sont des activateurs de la transcription dépendante de la boîte GCC dans les feuilles d'*Arabidopsis*. Par contre, AtERF3 et AtERF4 agissent comme des répresseurs qui réduisent le niveau de transcription mais aussi l'activité de trans-activation d'autres facteurs de transcription (Fujimoto *et al.*, 2000).

La communication entre les voies de signalisation de l'éthylène et du jasmonate détermine l'activation de nombreux gènes de défense. Ces voies convergent et agissent en synergie vers l'activation transcriptionnelle d'ERF1. En effet, une mutation qui bloque l'une ou l'autre des voies empêche l'induction d'ERF1. Cependant, l'expression de 35S:ERF1 permet de récupérer la réponse de défense chez les mutants déficient *coil* (*coronative insensitive1*) et *ein2* (*ethylene insensitive2*). L'analyse du transcriptome des plantes transgéniques 35S:ERF1 comparée à celui de plantes sauvages traitées à l'éthylène ou au jasmonate confirme qu'ERF1 régule *in vivo* l'expression de nombreux gènes de réponse à l'éthylène et au jasmonate. ERF1 agit en aval de l'intersection des voies de signalisation de l'éthylène et le jasmonate, et est un élément clé de l'intégration des signaux dans la régulation des gènes de défense (Lorenzo *et al.*, 2003).

ERF1 code un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes de réponse aux agents pathogènes afin de prévenir la progression de la maladie. Chez *Arabidopsis*, la sur-expression d'ERF1 confère une résistance aux champignons nécrotrophes tels que *B. cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002) et à des champignons du sol comme *Fusarium oxysporum* *sp. conglutinans* et *F. oxysporum* *f. sp. Lycopersici* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004). La sur-expression d'ERF1 de riz permet d'induire l'expression de deux gènes de réponse à l'éthylène, PDF1.2 et  $\beta$ -chitinase, et affecte significativement la croissance et le développement des plants transgéniques d'arabette (Hu *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent l'implication d'OsERF1 dans la réponse à l'éthylène. Les effets d'ERF1 sont opposés à ceux de AtMYC2, et leur interaction pourrait expliquer comment les plantes corrigent la réponse des stress induits par les pathogènes et la blessure (Lorenzo & Solano, 2005).

La création et la caractérisation de plantes transgéniques d'hévéa sur-exprimant ou éteint pour la fonction ERF1 est envisagée pour évaluer l'impact de ce gène sur la coordination des gènes de défense et d'étudier la communication entre les voies de signalisation de l'ET et du JA.

### **6.3 Identification des gènes candidats impliqués dans l'interaction entre l'éthylène, la blessure et le jasmonate par approche transcriptomique**

La dissection des phénomènes dépendants et indépendants de l'éthylène dans la signalisation des stress d'exploitation a été entreprise dans un premier temps par une approche pharmacologique utilisant des inhibiteurs d'action de l'éthylène (1-méthyl cyclopropane : 1-MCP) et de biosynthèse du jasmonate (acide diéthylthiocarbamique : DIECA), et est envisagée dans un second temps par la caractérisation des plantes transgéniques insensibles à l'éthylène.

En parallèle, les fenêtres d'expression d'un groupe de gènes intervenant à différents niveaux de signalisation et de réponse cellulaire sont en cours d'étude en réponse aux traitements éthylène, blessure et jasmonate. Nous avons retenu quelques gènes de référence intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène (*SAMS*, *ACS1*, *ACO1*, *ACO2*, *ACO3*, *CAS*) et du jasmonate (*AOX*, *AOS*), dans la signalisation des hormones (*ETR2-3*, *ETR2-5*, *MAPK4*, *EIN2-4*, *EIN3-12*, *ERF1*, *COI1-10*, *SAUR13*, *WRKY6*), la biosynthèse du caoutchouc (*HMGR*, *REF*, *IW3*), et la détoxification, des radicaux libres (*CAT*, *CuZnSOD*, *MnSOD*, *APX1*, *APX2*, *GCLch*, *GCLcy*). Ces informations permettront de déterminer la concentration et la durée d'application des traitements pour les échantillons à suivre en analyse comparative de transcriptomes. Parmi les gènes préalables étudiés, certains seront retenus comme contrôle de l'efficacité des traitements.

L'analyse des transcriptomes sera conduite par une approche SAGE sur des plantes sauvages ou transgéniques insensibles à l'éthylène ayant subis des traitements inducteurs (éthylène, blessure et/ou JA) et/ou inhibiteurs (1-MCP, DIECA). Les gènes candidats impliqués dans la signalisation et la réponse à ces stress seront ainsi identifiés puis caractérisés.

## 7 CONCLUSIONS

La culture de l'hévéa représente un intérêt en tant que source renouvelable de caoutchouc et de bois d'œuvre, et apporte un revenu régulier aux planteurs qui cultivent 80% des surfaces plantées. La forte demande en caoutchouc naturel et en bois incite les programmes de replantation avec du matériel clonal plus performant et l'extension des plantations vers des zones non traditionnelles de culture sujettes à des saisons froides ou de sécheresse. Ces zones L'accentuation du stress environnemental dans ces zones aggrave les problèmes d'encoche sèche.

Le clonage de l'hévéa permet de valoriser les produits de l'amélioration génétique et de réduire l'hétérogénéité des plantations. Le greffage de l'hévéa est la seule voie de multiplication des clones de scion. Les acquis de notre équipe sur la micropropagation permettent de disposer de matériel clonal franc-de-pied, rajeuni par embryogenèse somatique et multiplié par cette voie ou bien par microbouturage. La mise en place avec une équipe de Michelin de jardins à bois rajeunis devrait trouver des applications directes à moyen terme pour la production de clones greffés rajeunis. A ce jour, les autres types variétaux, comme les clones entiers ou de porte-greffe, sont produits à petite échelle pour la mise en place de dispositifs expérimentaux.

Les caractères de sélection sont principalement la croissance, la production de caoutchouc et de bois, et la résistance aux maladies foliaires. La sensibilité à l'encoche sèche est liée au métabolisme intrinsèque des clones. La greffe, l'interaction porte-greffe/greffon et l'environnement sont des facteurs aggravant ce syndrome chez des clones à métabolisme élevé. La collaboration établie depuis 2006 avec l'IRIEC en Indonésie permet de disposer de nouveaux génotypes multipliés par microbouturage pour la production de clones franc-de-pied et de clones de porte-greffe. Ce nouveau matériel ouvre des perspectives intéressantes sur le plan de l'étude de l'encoche sèche en liaison avec les facteurs précités. Un Consortium avec des partenaires publics et privés devrait permettre d'initier dès 2009-2010 un programme de sélection de clones de porte-greffe en Indonésie.

L'étude des mécanismes de défense des laticifères est une thématique scientifique originale qui permettra de mieux comprendre le rôle de ce tissu, le développement de l'encoche sèche et de modéliser ce système biologique unique. Dans le cadre de la collaboration avec l'université du Catas en Chine, nos travaux sur la signalisation des hormones de stress, et en particulier du jasmonate, et les technologies développées par le Plateau d'histologie et d'imagerie végétale de l'UMR DAP devraient apporter une contribution majeure à l'étude du rôle de cette hormone dans la différenciation des laticifères secondaires.

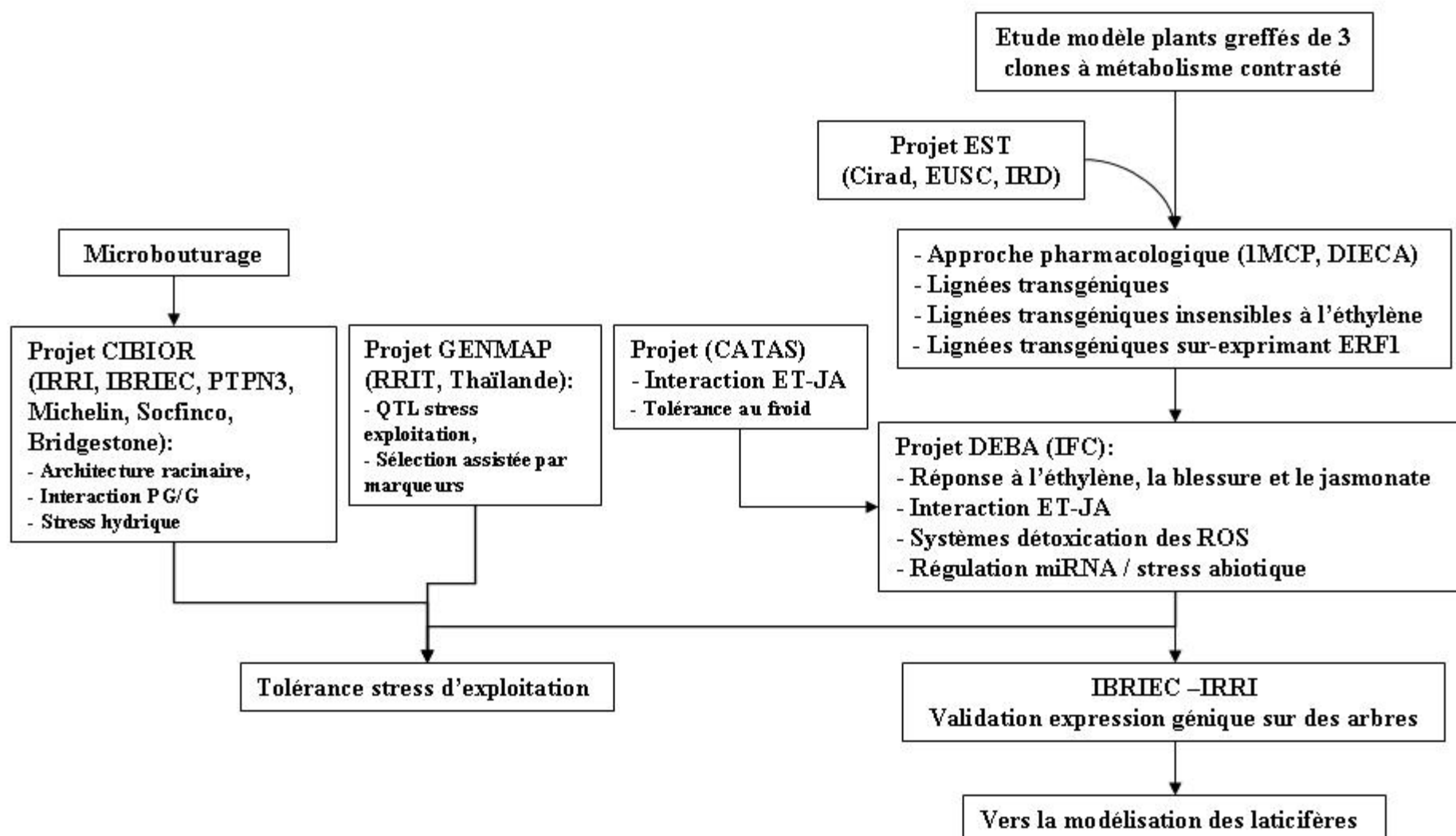
Face aux changements climatiques, la question de l'amélioration de l'hévéa dépasse désormais celle des rendements de production. Soumis à des contraintes hydriques et sanitaires de plus en plus importantes, l'adaptation rapide des hévéas est essentielle pour lutter contre ces stress et répondre à la demande en caoutchouc naturel. Dans ce cadre, j'ai mis en place une réflexion au niveau de notre équipe et celles des membres de l'IRRDB. Les forces de notre équipe BURST en matières de clonage par micropropagation et de transgénèse d'une part, et de l'UMR DAP en matières de génomique fonctionnelle sur le développement racinaire et la tolérance à la sécheresse d'autre part, m'incitent à définir une stratégie d'amélioration basée sur la sélection de clones de porte-greffe, l'étude de l'architecture

racinaire et des mécanismes de tolérance au déficit hydrique intégrant les acquis sur les voies de signalisation et de défense contre le stress oxydatif. Le développement de méthodes de micropropagation à grande échelle nécessaires à terme à la multiplication de ce matériel amélioré est en cours de transfert dans les équipes partenaires qui opéreront au changement d'échelle.

L'évolution des recherches sur l'hévéa dépend grandement de la disponibilité en ressources moléculaires. Nommé coordinateur du groupe biotechnologie de l'*International Rubber Research and Development Board* (IRRDB) en 2002, j'œuvre à l'acquisition d'informations et d'outils aux niveaux du transcriptome et du génome. Récemment, j'ai été sollicité par l'IRRDB et des sociétés de plantations pour coordonner un projet de séquençage du génome de l'hévéa. Ainsi, j'organise un quatrième atelier international intitulé *Hevea genome and transcriptome* qui se déroulera en juin 2009 au CIRAD. En sus des échanges scientifiques, cet atelier visera le montage d'un projet international de séquençage du génome de l'hévéa.

Les thématiques portées par l'équipe Burst sont menées dans l'axe développement et adaptation de l'UMR DAP. Notre intégration dans des réseaux nationaux et internationaux est chaque année plus évidente (Figure 5). Les connaissances acquises sur le clonage et le fonctionnement des cultures arborescentes tropicales permettent aux chercheurs de notre équipe d'intervenir dans des programmes d'enseignement en France et à l'étranger. Notre réflexion a conduit à préparer un module spécifique d'enseignement sur les voies d'amélioration et de compréhension des mécanismes de tolérance aux stress abiotiques chez ces espèces. Nos collaborations avec d'autres UR du Cirad et des équipes d'instituts de pays du Sud garantissent une exploitation du fruit de nos recherches. Ainsi, ces multiples interactions nous permettent de répondre à la fois aux mandats de notre UMR, du Cirad et de l'école doctorale Sibaghe.

**Figure 5.** Organisation des projets de recherche menés par l'équipe BURST autour de la réponse aux stress d'exploitation chez l'hévéa.





## 8 REFERENCES CITEES AUTRES QUE CELLES DU LABORATOIRE

- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. & Solano, R. (2002).** Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**, 23-32.
- Berrocal-Lobo, M. & Molina, A. (2004).** Ethylene response factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 763-770.
- Bustamante-Porras, J., Campa, C., Poncet, V., Noirot, M., Leroy, T., Hamon, S. & de Kochko, A. (2007).** Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. *Mol Genet Genomics* **277**, 701-712.
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1993).** Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Duan, C. (2004).** The regulation of Jasmonic acid on the rubber biosynthesis. *Chinese Journal of Tropical Agriculture* **5**, 57-64.
- Duan, C., Zeng, R., Li, Y. & Wei, X. (2005a).** Molecular cloning and gene characteristics of allene oxide synthetase(AOS) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* **submitted**.
- Duan, C., Zeng, R., Li, Y. & Wei, X. (2005b).** The cloning of AOS gene promoter and sequence analysis. In *Tropical Crops Conference*, pp. 8-9.
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. & Ohme-Takagi, M. (2000).** Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**, 393-404.
- Gamble, R. L., Qu, X. & Schaller, G. E. (2002).** Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiol* **128**, 1428-1438.
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H. L. & Kush, A. (1994).** Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem* **269**, 9278-9283.
- Hao, B.-Z. & Wu, J.-L. (1982).** Effects of wound (tapping) on laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*. *Acta Botanica Sinica* **24**, 388-391.
- Hao, B.-Z. & Wu, J.-L. (2000).** Laticifer Differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by Exogenous Jasmonic Acid and Linolenic Acid. *Annals of Botany* **85**, 37-43.
- Hu, Y., Zhao, L., Chong, K. & Wang, T. (2008).** Overexpression of OsERF1, a novel rice ERF gene, up-regulates ethylene-responsive genes expression besides affects growth and development in Arabidopsis. *J Plant Physiol*.
- Liu, H.-F., Wu, J.-L. & Hao, B.-Z. (2001).** Effect of jasmonic acid and other plant growth regulators on laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crop* **22**, 6-16.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J. & Solano, R. (2003).** ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165-178.
- Lorenzo, O. & Solano, R. (2005).** Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 532-540.
- Moeder, W., Barry, C. S., Tauriainen, A. A. & other authors (2002).** Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic Acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology* **130**, 1918-1926.
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. (2006).** Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **140**, 411-432.
- Norton, G., Pappusamy, A., Yusof, F., Pujade-Renaud, V., Perkins, M., Griffiths, D. & Jones, H. (2007).** Characterisation of recombinant *Hevea brasiliensis* allene oxide synthase: effects of cyclooxygenase inhibitors, lipoxygenase inhibitors and salicylates on enzyme activity. *Plant Physiol Biochem* **45**, 129-138.



- Ohme-Takagi, M. & Shinshi, H. (1995).** Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* **7**, 173-182.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K. & Shinshi, H. (2000).** Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiol* **41**, 1187-1192.
- Ohta, M., Ohme-Takagi, M. & Shinshi, H. (2000).** Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J* **22**, 29-38.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G. & other authors (2000).** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2109.
- Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. & Bleeker, A. B. (1999).** A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* **283**, 996-998.
- Ruonala, R., Rinne, P. L., Baghour, M., Moritz, T., Tuominen, H. & Kangasjarvi, J. (2006).** Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (*Betula pendula*) involve ethylene. *Plant J* **46**, 628-640.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002).** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 998-1009.
- Sanikhani, M., Mibus, H., Stummman, B. M. & Serek, M. (2008).** Kalanchoe blossfeldiana plants expressing the Arabidopsis etr1-1 allele show reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep* **27**, 729-737.
- Schaller, G. E. & Bleeker, A. B. (1995).** Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* **270**, 1809-1811.
- Silpi, U., Thaler, P., Kasemsap, P., Lacoite, A., Chantuma, A., Adam, B., Gohet, E., Thaniswanyankura, S. & Ameglio, T. (2006).** Effect of tapping activity on the dynamics of radial growth of *Hevea brasiliensis* trees. *Tree Physiol* **26**, 1579-1587.
- Siwei, F., Wannia, Y. & Shaoqiong, Y. (1986).** Endogenous ethylene formation in *Hevea* bark tissues through ethephon induction. In *Proc IRRDB Rubber Physiol Expl Meeting*, pp. 59-67. SCATC, Hainan, China.
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleeker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M. & Klee, H. J. (1997).** A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nat Biotechnol* **15**, 444-447.
- Wu, J.-L., Hao, B.-Z. & Tan, H.-Y. (2002).** Wound-induced laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid. *Journal of Rubber Research* **5**, 53-63.
- Zhang, G., Chen, M., Chen, X. & other authors (2008).** Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (*Glycine max* L.). *J Exp Bot*.
- Zhuang, J., Cai, B., Peng, R. H. & other authors (2008).** Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 468-474.

UNIVERSITE MONTPELLIER II  
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC  
RAPPORT DE SOUTENANCE HDR

Nom et prénom : **MONTORO PASCAL**

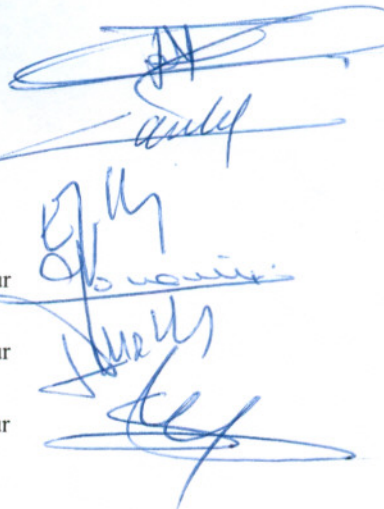
Date de la soutenance : 12/06/2009

Pascal Montoro a présenté un bilan et des perspectives de ses recherches menées sur l'Hévéa depuis son intégration au CIRAD, à travers un exposé très vivant, clair et très bien illustré. Il ressort de ce bilan que Pascal Montoro, d'abord en tant que chercheur, puis à travers sa prise de responsabilité de l'équipe Hévéa puis BURST au sein des UMR BEPC puis DAP, a su maintenir et renouveler le positionnement de son équipe en leader mondial en biotechnologie de l'hévéa, espèce ligneuse non modèle, notamment pour la micropropagation, la transformation et la physiologie moléculaire. Le projet présente des approches de génomique fonctionnelle destinées à mieux comprendre les mécanismes sous tendant les deux stress d'exploitation majeurs de l'hévéa : la blessure et l'application d'éthylène. Le projet de recherche est apparu robuste et intégratif, couvrant des démarches exploratoires et analytiques fines destinées à mieux comprendre les rôles des formes actives de l'oxygène, de l'éthylène et de l'acide jasmonique. La contribution au développement de ressources de génomique fonctionnelle est aussi envisagé (banques d'EST...). Il apparaît clairement que Pascal Montoro est un chercheur confirmé, autonome, créatif, ayant une production scientifique régulière et de qualité. Ses qualités relationnelles et de communication sont de plus des atouts dont il tire profit pour animer son équipe, créer des collaborations avec des partenaires privés (Michelin) et jouer un rôle moteur à l'International à travers sa participation au réseau « International Ruber Research Development Board ». Il est à souligner que Pascal Montoro a travaillé plusieurs années en expatriation, période durant laquelle il a initié la mise au point de la transformation génétique en Thaïlande et qu'il s'est impliqué dans l'enseignement dans différentes formations de biotechnologie à l'étranger.

*Le Jury, après avoir délibéré a décerné le Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches*

*Signature Membres du Jury (préciser le président) :*

CARRON	MARC-PHILIPPE	Membre
GANTET	PASCAL <i>Président</i>	Membre
GUIDERDONI	EMMANUEL	Membre
JOUANIN	LISE	Rapporteur
PECH	JEAN-CLAUDE	Rapporteur
SAKR	SOULAIMAN	Rapporteur



PROCES VERBAL DE SOUTENANCE DU 12/06/2009 A 14h00

ANNEE UNIVERSITAIRE 2008/2009

Etudiant : M. PASCAL MONTORO né le : 29/10/1963

Version de diplôme : HDR Sciences de la Vie

Titre des travaux : " Bases moléculaires de la tolérance aux stress d'exploitation chez Hevea brasiliensis. "

Lieu de soutenance : Amphi Alliot, Cirad, av. Agropolis, Montpellier

La soutenance est publique.

Résultat : *Admis*

Mention :

Membres du Jury

Nom	Qualité	Etablissement	Rôle	Signature
M. LISE JOUANIN	Directeur de Recherche <i>CNRS</i> <del>INRA</del>	<i>INRA Versailles</i>	Rapporteur	<i>[Signature]</i>
M. JEAN-CLAUDE PECH	Professeur d'Université	INPT Toulouse	Rapporteur	<i>[Signature]</i>
M. SOULAIMAN SAKR	Professeur	<i>AGROCANPUS AEST, Angers</i>	Rapporteur	<i>[Signature]</i>
M. MARC-PHILIPPE CARRON	Habilité à Diriger des Recherches	<i>CIRAD Montpellier</i>	Membre	<i>[Signature]</i>
M. PASCAL GANTET	Professeur	UNIVERSITE MONTPELLIER 2	Membre	<i>[Signature]</i>
M. EMMANUEL GUIDERDONI	Directeur de Recherche	<i>CIRAD Montpellier</i>	Membre	<i>[Signature]</i>